

بسم الله الرحمن الرحيم



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی استان قزوین

دانشکده پزشکی شهید بابایی

پایان نامه جهت اخذ درجه دکترای عمومی پزشکی

عنوان:

بررسی فراوانی اینتگرون کلاس یک در ایزوله های کلبسیلا پنومونیه جمع آوری شده از
بیمارستان های شهرهای تهران و قزوین

استاد راهنما: آقای دکتر امیر پیمانی

استاد مشاور: آقای دکتر امیر جوادی

نویسنده: حسین فقیه

تابستان ۹۴

چکیده.....	۴
مقدمه و اهمیت موضوع.....	۶
معرفی خانواده انتروباکتریاسه.....	۶
ویژگی های شاخص و مشترک خانواده انتروباکتریاسه.....	۹
گونه های کلبسیلا.....	۱۲
مقاومت های دارویی.....	۱۲
مکانیسم های ایجاد مقاومت در باکتری ها.....	۱۳
منشاء غیر ژنتیکی مقاومت.....	۱۷
منشاء ژنتیکی مقاومت.....	۱۷
اینترگون ها.....	۱۸
پنی سیلین های طبیعی.....	۲۰
پنی سیلین های نیمه صناعی.....	۲۱
سفالوسپورین ها و سفامايسين ها.....	۲۱
کارباپنم ها.....	۲۳
مونوباکتام ها.....	۲۴
اصول طبقه بندی بتالاكتامازها.....	۲۶
تعریف آمینوگلیکوزیدها.....	۳۳
مکانیسم های مقاومت به فلوروکینولونها.....	۳۴
الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در بخش مراقبت ویژه (ICU).....	۳۵
اهمیت بالینی جداسازی اینترگون ها.....	۳۶
فاکتورهای خطر در انتشار اینترگون ها.....	۳۶
روش های کنترل عفونت.....	۳۷
هدف اصلی.....	۳۸

۳۸.....	اهداف فرعی.....
۳۸.....	اهداف کاربردی.....
۳۸.....	فرضیات یا سوالات پژوهشی.....
	فصل دوم
۳۹.....	مروری بر مطالعات انجام شده.....
	فصل سوم : مواد و روش ها
۴۳.....	جامعه مورد مطالعه و روش نمونه گیری.....
۴۴.....	نمونه برداری.....
۴۵.....	تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی به روش Disk Agar Diffusion.....
۴۶.....	بررسی ملکولی شیوع اینتگرون کلاس یک.....
۴۷.....	استخراج DNA.....
۴۷.....	آماده سازی پرایمرها.....
۴۸.....	انجام آزمون PCR.....
۴۹.....	آماده سازی واکنش PCR.....
۵۰.....	برنامه ریزی دستگاه ترموسایکلر (Thermocycler).....
۵۰.....	الکتروفورز محصولات PCR.....
۵۱.....	کنترل کیفی.....
۵۱.....	بررسی ارتباط بین حضور اینتگرون و مقاومت آنتی بیوتیکی.....
	فصل چهارم: یافته ها
۵۵.....	الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی.....
۵۶.....	شناسایی ملکولی اینتگرون کلاس یک.....
۵۷.....	ارتباط مابین حضور اینتگرون کلاس یک و الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی.....
	فصل پنجم
۵۸.....	بحث و نتیجه گیری نهایی.....
۶۴.....	پیشنهادهات.....
۶۵.....	منابع.....

جداول و نمودارها

- جدول ۱-۱: طبقه بندی خانواده کلبسیلا یاسیه..... ۸
- جدول ۱-۲: طبقه بندی بتالاکتامازها..... ۲۹
- جدول ۱-۳: ژن های بتالاکتامازی کلاس ملکولی A با منشا اینتگرون..... ۳۱
- جدول ۱-۴: ژن های بتالاکتامازی کلاس ملکولی B با منشا اینتگرون..... ۳۲
- جدول ۱-۵: ژن های بتالاکتامازی کلاس ملکولی D با منشا اینتگرون..... ۳۳
- جدول ۳-۱: مقادیر بهینه برای تهیه master mix یک واکنش PCR..... ۴۵
- تصویر ۳-۱: انجام الکتروفورز محصول PCR..... ۴۸
- جدول ۳-۳: شرایط برنامه ریزی دستگاه ترموسایکلر در یک واکنش PCR..... ۵۰
- نمودار ۱-۴: فراوانی ایزوله های گونه های کلبسیلا بر حسب بخش های بیمارستانی..... ۵۶
- نمودار ۲-۴: فراوانی ایزوله های گونه های کلبسیلا بر حسب نمونه های بالینی..... ۵۴
- نمودار ۳-۴: فراوانی ایزوله های گونه های کلبسیلا بر حسب جنس..... ۵۴
- جدول ۱-۴: حضور اینتگرون کلاس یک در ایزوله های گونه های کلبسیلا با مقاومت دارویی
- چندگانه..... ۵۶
- جدول ۲-۴: بررسی مقایسه ای الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله های گونه های کلبسیلا اینتگرون
- مثبت و منفی..... ۵۸

چکیده:

معرفی: گونه های کلبسیلا به عنوان یکی از عوامل مهم عفونت های بیمارستانی است که عفونت های مختلفی را ایجاد می کند. در سالهای اخیر گزارشات فراوانی مبنی بر حضور گونه های کلبسیلا با الگوی مقاومت دارویی چندگانه در بخش های بالینی بیمارستان های سراسر جهان وجود دارد. اینتگرون کلاس یک شایعترین کلاس اینتگرونی دخیل در انتقال فاکتورهای مقاومت دارویی در ایزوله های کلبسیلا است که مقدمات ایجاد ایزوله های مقاوم را فراهم می سازد. هدف از این مطالعه بررسی شیوع اینتگرون کلاس یک در ایزوله های کلبسیلا و بررسی ارتباط ما بین حضور اینتگرون کلاس یک و الگوهای مقاومت دارویی در ایزوله های این ارگانسیم است.

روش کار: در مجموع ۱۰۰ ایزوله بالینی کلبسیلا از بیمارستان های مورد مطالعه در قزوین و تهران جمع آوری شد. تمامی ایزوله ها ابتدا با روش های استاندارد آزمایشگاهی تعیین هویت شدند و سپس الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی در برابر آنتی بیوتیک های منتخب به روش استاندارد دیسک آگار دیفیوژن (کربی بوئر) مطابق دستورالعمل CLSI انجام شد. در ادامه تمامی ایزوله ها از نظر حضور اینتگرون کلاس یک با استفاده از آزمون PCR بررسی شدند و ارتباط مابین حضور اینتگرون و الگوی مقاومت دارویی چندگانه و همچنین الگوهای مختلف مقاومت دارویی سنجیده شد.

نتایج: از مجموع ۱۰۰ ایزوله، ۶۳ ایزوله (۶۳٪) الگوی مقاومت دارویی چندگانه را نشان دادند. در بین ایزوله های با مقاومت دارویی چندگانه، ۵۲ ایزوله (۸۲٪/۵) دارای اینتگرون کلاس یک بودند. ارتباط کاملاً "معنی داری مابین الگوی مقاومت دارویی چندگانه و حضور اینتگرون کلاس یک مشخص شد. همچنین در ادامه مشخص شد که ارتباط معنی داری مابین حضور اینتگرون کلاس یک و مقاومت به آمینوگلیکوزیدها و اکثر داروهای بتالاکتام وجود داشت.

بحث: نتایج این مطالعه حاکی از شیوع بالای اینتگرون کلاس یک در ایزوله های کلبسیلا جدا شده از بخش های بالینی بیمارستان های مورد مطالعه است. با توجه به ارتباط معنی دار حضور اینتگرون کلاس یک در گونه های مقاوم جدا شده از بیمارستان های مورد مطالعه، اعمال ابزارهای مناسب کنترل عفونت و راهکارهای مناسب درمانی در بخش های مختلف بیمارستان مورد مطالعه برای جلوگیری از انتشار بیشتر آنها ضروری است.

مقدمه و اهمیت موضوع: بیماری های عفونی و درمان آنها از مشکلات اساسی زندگی بشر می باشند؛ که نوع آدمی همواره از بدو پیدایش و زیستن، به گونه ای، با آن ها دست به گریبان بوده است. پس از گذشت سالیان متمادی از آغاز عصر شیمی درمانی ضد میکروبی، درمان بیماریها به سبب ظهور سویه های مقاوم میکروبی، بیش از پیش پیچیده شده است. بطوری که کاربرد داروهای ضد میکروبی، در معرض تحلیل انتقادی زیادی قرار گرفته است. هر چند در ابتدا مقاومت ها نسبت به برخی از آنتی بیوتیک ها از سراسر جهان گزارش می شد ولی در سالهای اخیر شاهد بروز ایزوله های باکتریایی با الگوی مقاومت دارویی چندگانه هستیم. بنا به اهمیت و نقش قابل توجه باکتری های خانواده کلبسیلاسیه در ایجاد عفونت های مختلف در کلینیک و بیمارستان ها به عنوان محیطهای غنی از انواع آنتی بیوتیک در حال حاضر شاهد افزایش بروز اعضای این خانواده با الگوی مقاومت دارویی چندگانه هستیم. در سال ۱۹۷۰ نقش عناصر ژنتیکی سیار از جمله پلاسمیدها در ایجاد مقاومت های دارویی مختلف شناسایی شد و در سال های بعد یعنی اواخر دهه ۱۹۸۰ نقش اینتگرون ها به عنوان دیگر عنصر سیار ژنتیکی دخیل در انتقال فاکتور های مقاومت دارویی مشخص تر شد.

معرفی خانواده انتروباکتریاسه:

خانواده ی انتروباکتریاسه گروه بزرگی از باکتری ها هستند که به طور طبیعی در آب، خاک و مواد در حال فساد و تجزیه وجود دارند، ولی جایگاه اصلی آنها در روده ی انسان ها و حیوانات می باشد و به همین جهت به نام باکتری های انتریک یا روده ای از آنها یاد می شود. بعضی از اعضای این خانواده از جمله سالمونلا و شیگلا از عوامل مهم گاستروانتریت می باشند(۱).

بیش از بیست و پنج جنس، و یک صد و ده گونه، در این گروه از باکتری ها تشخیص داده شده اند؛ که بیست تا بیست و پنج گونه ی آن ها از نظر کلینیکی مهم هستند. بخش عمده ای از اعضای این خانواده، جزء نرمال فلور روده بوده و در عملکرد نرمال روده نقش دارند. باکتری های

جنس کلبسیلا نیز به عنوان اعضای مهم خانواده انتروباکتریاسه، به عنوان فلور طبیعی در روده حضور دارند. این ارگانسیم ها، گاهی در تعداد کم به عنوان جزئی از فلور طبیعی مجاری فوقانی تنفسی و مجاری تناسلی یافت می شوند. این باکتری ها عموماً در خاستگاه واقعی خود بیماری ایجاد نمی کنند؛ اما وقتی که به بافت های خارج از محل طبیعی شان وارد شوند، می توانند بیماری ایجاد کنند و به همین جهت پاتوژن های فرصت طلب محسوب می شوند (۱).

در حال حاضر بر اساس جدیدترین طبقه بندی، خانواده انتروباکتریاسه را به ۷ گروه تقسیم می کنند، که عبارتند از:

۱- Eschericeae : اشرشیا مانند اشرشیا کولی (*E.coli*) و شیگلا

۲- Salmonelleae : شامل سالمونلا، آریزونا و سیتروباکتر

۳- Edvardsieleae : شامل ادواردسیلا

۴- Proteae : شامل پروتئوس ها، مورگانلا و پروویدنسیا

۵- Kelebsielleae : شامل کلبسیلا، کلبسیلا، هافنیا و سراسیا

۶- Yercinieae : شامل یرسینیا

۷- Erwiniae : شامل اروینیا (بیشتر در گیاهان وجود دارند و غیر بیماری زا هستند) (۲).

جدول ۱-۱: طبقه بندی خانواده کلبسیلا (یاسیه) (۲)

Tribe	Genus	Species	Tribe	Genus	Species
I. Escherichieae	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i> <i>blattae</i> <i>vulneris</i> <i>fergusonii</i> <i>hermanii</i>	V. Klebsielleae, cont'd		<i>gergoviae</i> <i>dissolvens</i> <i>nimipressuralis</i> <i>asburiae</i> <i>cancerogenus</i> <i>(taylorae)</i> <i>hormaechei</i>
	<i>Shigella</i>	<i>dysenteriae</i> <i>flexneri</i> <i>boydii</i> <i>sonnei</i>		<i>Hafnia</i> <i>Serratia</i>	<i>alvei</i> <i>marcescens</i> <i>liquefaciens</i> <i>rubidaea</i> <i>fonticola</i> <i>odorifera</i> <i>plymuthica</i> <i>ficaria</i>
II. Edwaedsielleae	<i>Edwardsiella</i>	<i>tard</i> <i>hoshinae</i> <i>ictaluri</i>			<i>agglomerans</i> <i>mirabilis</i> <i>vulgaris</i> <i>penneri</i> <i>myxofaciens</i>
III. Salmonelleae	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i> <i>bongori</i>		<i>Pantoea</i> <i>Proteus</i>	<i>morganii</i> <i>alcalifaciens</i> <i>stuartii</i> <i>rettgeri</i> <i>rustigianii</i>
IV. Citrobacteriaceae	<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i> <i>diversus (koseri)</i> <i>amalonaticus</i>	VI. Proteeae		<i>pseudotuberculosis</i> <i>pestis</i> <i>enterocolitica</i> <i>frederiksenii</i> <i>kristensenii</i> <i>intermedia</i> <i>ruckeri</i> <i>aldovae</i>
V. Klebsielleae	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> <i>pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i> <i>oxytoca</i> <i>pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i> <i>planticola</i> <i>terrigena</i> <i>ornithinolytica</i>	VII. Yersinieae	<i>Yersinia</i>	
	<i>Enterobacter</i>	<i>aerogenes</i> <i>cloacae</i> <i>agglomerans</i> <i>complex</i> <i>amnigenus</i> <i>sakazakii</i>			

Modified from Ewing WH: *Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae*, ed 4, East Norwalk, Conn, 1986, Appleton & Lange.

ویژگی های شاخص و مشترک خانواده انتروباکتریاسه:

- این باکتری ها از لحاظ ساختاری به شکل میله ای کوتاه و گرم منفی هستند.
- هوازی- بی هوازی اختیاری هستند.
- تخمیر گلوکز را به اکسیداسیون آن ترجیح می دهند، که این امر، غالباً با تولید گاز همراه است.
- می توانند نیتрат را به نیتريت احیاء نمایند.
- فاقد اسپورند.
- برخی از اعضای این خانواده به واسطه تاژک هایی که در سرتاسر سلول وجود دارد، متحرکند و برخی از آنها غیر متحرک اند.
- روی محیط های کشت حاوی پپتون یا عصاره ی گوشت، بدون اضافه کردن سدیم کلراید یا مواد دیگر رشد می کنند.
- روی محیط مک کانکی آگار به خوبی رشد می کنند.
- غالباً روی محیط کشت کلنی های گرد و محدب با لبه های صاف ایجاد می کنند. (جاوتز)
- در محتوای مولکول DNA ، درصد شمارش "G+C" ، ۳۹ تا ۵۹٪ است (۱، ۲).

گونه های کلبسیلا

ارگانیسم های جنس کلبسیلا (با نام قبلی آئروباکتر) ساکن آب و خاک بوده و با شیوع کمتری در روده بزرگ انسان و حیوان حضور دارند.

این ارگانیسم متحرک بوده و به سادگی بر روی محیط های کشت معمول آزمایشگاهی رشد می کند. هر چند این ارگانیسم ها نسبت به ارگانیسم های جنس کلبسیلا و اشریشیاکلی کمتر از نمونه های بالینی جدا می شوند اما توانایی ایجاد عفونت در هر یک از اعضای بدن را دارند. در حال

حاضر گزارشات فراوانی از ایجاد عفونت های مختلف بالینی به ویژه در محیط های بیمارستانی از این ارگانیزم وجود دارد. این ارگانیزم ها در ایجاد بیماری های مهمی از جمله پنومونی، عفونت های مجاری ادراری (UTI) (خصوصاً در ارتباط با کاتترهای ادراری)، مجاری تحتانی تنفسی، پوست، بافت نرم، خون و هم چنین نقش آن ها در بیماری هایی مثل آندوکاردیت، باکتری، ورم عفونی مفاصل، التهاب های موضعی استخوان، و عفونت های چشمی در بخش های مختلف بیمارستانی به ویژه بخش ICU وجود دارد. کلبسیلاها هم چنین می توانند سبب عفونت زخم و نواحی جراحی نیز بشوند. همچنین این باکتری ها به میزان کمتر، از سینوزیت بیمارستانی، مننژیت های مرتبط با جراحی مغز و اعصاب، استئومیلیت، مننژیت، سپسیس نوزادی (خصوصاً در نوزادان نارس) و باکتری (به ویژه در بیماران همراه با تب و نوتروپنی) و به ندرت اندوکاردیت جدا شده اند (۳-۶).

گونه های مختلف جنس کلبسیلا که تا کنون شناسایی شده اند به شرح ذیل می باشند:

- Enterobacter aerogenes*
- Enterobacter cloacae*
- Enterobacter agglomerans*
- Enterobacter gergoviae* (medical-dictionary.thefreedictionary.com)
- Enterobacter amnigenus*
- Enterobacter asburiae*
- Enterobacter cancerogenus*
- Enterobacter cowanii*
- Enterobacter dissolvens*
- Enterobacter hormaechei*

-*Enterobacter intermedius*

-*Enterobacter kobei*

-*Enterobacter ludwigii*

-*Enterobacter nimipressuralis*

-*Enterobacter pyrinus*

-*Enterobacter sakazakii*

از میان گونه های فوق الذکر، دو گونه ی کلبسیلا کلواکه و کلبسیلا آئروژنز، به عنوان مهمترین عوامل ایجادکننده ی عفونت های بیمارستانی محسوب می شوند و غالبا" از عفونت های بالینی جدا می شوند(۷).

با بررسی بیشتر مطالعات مشخص شده است که بیشترین موارد ابتلا به این ارگانیسم در افراد مسن، افراد با بیماریهای زمینه ای و افراد بستری در بخش های بحرانی بیمارستان از جمله ICU گزارش می شود. همچنین این باکتری ها در محیط های بیمارستانی غالبا از طریق پرسنل بیمارستان و هم چنین به هنگام استفاده از ابزارهایی همچون کاتترهای ادراری، کاتترهای داخل عروقی و لوله های تراشه بین بیماران انتشار می یابند؛ و در بیمارانی که به مدت طولانی بستری می شوند، و یا بیمارانی که از سیستم ایمنی با کارایی کافی برخوردار نیستند(مانند هنگام از دست رفتن عملکرد نوتروفیل ها و ایمنی سلولی و هومورال)، و هم چنین در کودکان و سالخوردگان، مشکلات عدیده ای را پدید می آورند. این مشکلات زمانی پیچیده تر می شوند که بیمار، به داروهای ضد میکروبی پاسخ نداده و به عبارت بهتر باکتری های ایجاد کننده ی بیماری به داروهای معمول مقاوم شده باشند(۸-۱۱).

مقاومت های دارویی:

داروهای ضد میکروبی از پرمصرف ترین انواع داروها هستند که در صورت استفاده صحیح نجات بخش خواهند بود و در عین حال استفاده نادرست و نابجا، باعث افزایش هزینه، عوارض، مقاومت دارویی، و بی ارزش شدن آنها می گردد. استفاده منطقی از داروهای ضد میکروبی، به فهم نحوه عملکرد، فارماکوکنتیک، عوارض دارویی، تداخلات و روش های کاهش مقاومت و حساسیت میکروبی در آزمایشگاه بستگی دارد. پدیده بروز "مقاومت دارویی" چند سال است که توجه دانشمندان و محافل علمی را به خود جلب کرده است. پیش بینی می شود که با وجود سرعت بسیار بالای ایجاد مقاومت دارویی تا چند دهه دیگر همه آنتی بیوتیک ها بی اثر خواهند شد و این، یعنی این که شاید بشر به دوران قبل از کشف پنی سیلین باز گردد! زیرا هر از گاهی گزارشاتی جدید از بروز مقاومت دارویی به آنتی بیوتیک ها منتشر می گردد. در حال حاضر پزشکان در درمان بیماران مبتلا به این میکروارگانیسم های مقاوم، دچار محدودیت های فراوانی می باشند؛ چرا که به سبب بروز مقاومت های متنوع دارویی، بسیاری از این داروهای شگفتی آفرین که تا کنون زندگی انسان های بی شماری را نجات داده اند، به آخر خط رسیده اند.

منظور از مقاومت آنتی بیوتیکی توانایی باکتری یا سایر میکروب ها به مقاومت در برابر اثر آنتی بیوتیک ها با استفاده از مکانیسم های متفاوت است. اگر چه تعداد زیادی از موارد مقاومت به دارو در باکتری ها یک صفت ذاتی است اما در بسیاری از موارد نیز این پدیده در اثر فشار آنتی بیوتیکی ایجاد شده و در واقع به وسیله ی ارگانیسم کسب می گردد (۱۲-۱۴).

مکانیسم های ایجاد مقاومت در باکتری ها:

- تغییر نفوذ پذیری میکروارگانیسم نسبت به دارو:

کاهش نفوذ پذیری، از طریق عملکرد کانال های غشاء سلولی (پورین ها) اعمال می شود که اجازه ی ورود دارو را به داخل سلول نمی دهند. ژن های این نوع مقاومت، غالباً منشاء پلاسمیدی دارند. (۱۷-۱۵)

- از طریق پمپ افلاکس:

میکروارگانیسم کانال های پروتئینی متعددی در غشاء دارد، که در انتقال تعداد زیادی از مواد غذایی و ترکیبات سمی نقش دارند. در میان این انتقال دهنده ها، پمپ های efflux نقش اساسی در خروج آنتی بیوتیک ها از داخل سلول داشته و این مواد را از درون سلول به محیط خارج پمپ می کنند. بنابراین باعث کاهش غلظت آنتی بیوتیک ها در فضای پری پلاسمی باکتری های گرم منفی می گردند. افزایش بیان یک یا چند پمپ efflux باعث ممانعت از تجمع داخل سلولی، در حد آستانه ی مورد نیاز برای فعالیت داروها می گردد. (۲۰-۱۸)

- تغییر گیرنده های میکروارگانیسم برای داروها:

ژن های این نوع مقاومت ها، غالباً کروموزومی هستند. برای مثال مقاومت به آمینوگلیکوزیدها که منشاء کروموزومی دارد، معمولاً همراه با از دست دادن یا عوض شدن پروتئین هایی است، که در قطعه ی کوچک ریبوزوم، به عنوان گیرنده ی دارو عمل می کنند؛ و یا تغییر در پروتئین های اتصال به پنی سیلین ها (PBPs) به ویژه PBP-2 که نقش بسزایی در شکل گیری ساختمان باکتری دارد (۲۱).

- دستیابی میکروارگانیسم به مسیرهای متابولیک فرعی :

این امر، واکنش مهار شده توسط دارو را جبران می نماید. به عنوان مثال در باکتری ها، PABA یکی از عوامل سازنده ی اسید فولیک است. اگر آنزیم "دی هیدرو پتروات سنتتاز" که وظیفه تبدیل PABA به اسیدفولیک را عهده دار است، توسط سولفونامید مهار شود،

دیگر نمی تواند در واکنش تبدیل PABA به اسید فولیک شرکت نماید، و در نتیجه اسید فولیک ساخته نمی شود. اسید فولیک در سنتز اسیدهای نوکلئیک نقش مهمی دارد و به همین جهت عدم سنتز آن، به توقف رشد سلول، منجر می گردد. برخی از باکتری ها، نیاز به PABA خارج سلولی ندارند و همانند سلول های پستانداران، می توانند از اسید فولیک از پیش تشکیل شده، استفاده کنند و به همین دلیل به سولفونامید مقاومند (۲۲).

- تولید آنزیم های بتالاکتاماز:

این آنزیم ها سبب تخریب داروی فعال می گردند. ژن های این نوع مقاومت های دارویی اکثراً از طریق پلاسمید منتقل می شوند. برای مثال، پلاسمیدهای مسئول مقاومت نسبت به پنی سیلین و سفالوسپورین ها، دارای ژن های مربوط به سنتز آنزیمی به نام بتالاکتاماز یا پنی سیلیناز می باشند، که حلقه ی بتالاکتام موجود در هسته ی مرکزی این داروها را تخریب کرده و ترکیب غیر فعالی به نام اسید پنی سیلوئیک یا اسید فنولیک باقی می گذارد.

در مجموع، مقاومت با جهش ژن ها یا اکتساب ژن جدید به وجود می آید. ژن های جدید عامل مقاومت، معمولاً سلول به سلول، توسط عناصر متحرک ژنتیکی مثل پلاسمید، ترانس پوزون و باکتریوفاژ منتشر می شوند. هم چنین، ژن های بسیاری از بتالاکتامازهای جدید، بر روی اینتگرون ها یافت شده است. اینتگرون ها، عناصری هستند که می توانند در پلاسمیدها، کروموزوم ها و یا ترانس پوزون ها جای گیرند. این عناصر از جمله فاکتورهای دخیل، در توسعه ی مقاومت های چندانگانه بوده و همانند پلاسمیدها و ترانسپوزون ها، جزء مولفه های ژنتیکی متحرک، در کسب و انتشار عوامل مقاومت می باشند (۲۳).

مطابق نظریه ترکیبی انتخاب طبیعی، اثبات شده است که در جایی که مقدار زیادی داروهای ضد میکروبی مصرف می شود، باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک، به سبب شانس بقای بیشتر نسبت به باکتری های غیر مقاوم (حساس به آنتی بیوتیک)، باقی مانده و تکثیر می کنند. در نتیجه،

فراوانی نسبی شان، به تدریج افزایش می یابد و اغلب افراد جمعیت را همین باکتری های مقاوم تشکیل می دهند.

در حال حاضر داروهایی که به طور معمول برای درمان بیماریهای ناشی از گونه های کلبسیلا ، مورد استفاده قرار می گیرند، از خانواده ی داروهای بتالاکتام می باشند که از طریق "مهار سنتز دیواره ی سلولی" عمل می نمایند:

چنان که می دانیم، دیواره ی سلولی باکتری ها، به عنوان یک لایه ی مستحکم، علاوه بر تعیین شکل میکروارگانیسم، از سلول باکتری در مقابل فشار اسموتیک بالای آن محافظت می کند. آسیب به دیواره ی سلول چه از طریق تاثیر آنزیم های لیزوزومی و چه از طریق مهار تولید آن توسط دارو، به متلاشی شدن آن خواهد انجامید.

این دیواره از یک پلیمر پپتیدوگلیکان (مورین) پیچیده و دارای پیوند متقاطع تشکیل شده است. این پلی ساکارید حاوی قندهای N – استیل گلوکزآمین (NAG) و N – استیل مورامیک اسید (NAM) به شکل یک درمیان می باشد، یک پپتید پنج اسید آمینه ای (پنتاپپتید) نیز، به NAM متصل میباشد. این پپتید به D – آلانین – D – آلانین، ختم می شود. در طول ساخته شدن دیواره سلولی، پروتئین هایی به نام پروتئین های متصل شونده به پنی سیلین (PBPs) که در واقع گروه بزرگی از آنزیم های کربوکسی پپتیداز و ترانس پپتیداز هستند، با جدا کردن D – آلانین انتهایی، باعث شرکت دی آلانین ماقبل آخر، در واکنش ایجاد تقاطع عرضی(ترانس پپتیداسیون) می شوند؛ و به این ترتیب، نقش خود را در ساخت دیواره ی سلولی باکتری، ایفا می نمایند. داروهای بتالاکتام، با اتصال به این پروتئین ها (PBPs)، عمل ترانس پپتیداسیون یعنی ایجاد اتصال متقاطع در ساخت دیواره ی سلولی را مهار می کنند؛ در نهایت آنزیمهای اتولیتیک که هیدرولازهای مورین نام دارند، فعال شده و موجب تخریب پپتیدوگلیکان می شوند؛ به این ترتیب

سلول با از دست دادن دیواره، در مقابل فشار بالای اسمزی درون خود تاب نیاورده و متلاشی خواهد شد.

ارتباط بین مهار فعالیت PBP ها، و فعال شدن آنزیم های اتولیزین هنوز بدرستی مشخص نیست. ترانس پپتیدازها، عموماً در فضای پری پلاسمی قرار دارند.

داروهای بتا لاکتام در باکتریهای گرم مثبت با انتقال مستقیم و در باکتریهای گرم منفی، یا از طریق کانال های پورین و یا از طریق انتشار ثانویه از غشاء خارجی باکتریها به درون راه یافته و با PBP ها به شکل کووالان واکنش می دهند و در واقع با استیله کردن این آنزیم ها آنها را غیرفعال می سازند.

تعداد PBP ها در باکتریها متفاوت است و هر یک از آنتی بیوتیک های بتالاکتام، به PBP خاصی متصل می شود. به عنوان مثال استافیلوکوک ها، ۴ نوع PBP دارند و اشیشیاکلی حداقل ۷ نوع PBP دارد. در اشیشیاکلی، PBP1a,1b که وزن مولکولی بالایی دارد، درواقع ترانس پپتیدازی است که مسئول ساخت پپتیدوگلیکان می باشد. مهار ترانس پپتیدازها می تواند باعث تشکیل اشکال کروی در این باکتری ها و لیز سریع آنها شود. مهار سایر PBP ها ا ز جمله PBP-2 ممکن است که با تأخیر بیشتری باعث لیز باکتریها شود و یا اینکه با مهار PBP-3 باکتریها به شکل رشته ای در آیند(۲۴).

فراوان ترین و مهم ترین مکانیسم مقاومت به داروهای بتالاکتام، تولید آنزیم های هیدرولیز کننده بتالاکتام ها می باشد. درواقع این آنزیم ها که سرین پروتئاز هستند، با اتصال به آنتی بیوتیک های بتالاکتام و با ایجاد پیوند کووالان، و با تخریب پیوند آمیدی موجب غیرفعال شدن این داروها می شوند. به طور کلی مقاومت به دارو در باکتری ها، به سبب عناصر ژنتیکی و یا ماهیت غیر ژنتیکی اتفاق می افتد.

منشاء غیر ژنتیکی مقاومت:

آنتی بیوتیک هنگامی بر باکتری موثر است که باکتری از لحاظ متابولیکی فعال باشد. باکتری هایی که از لحاظ متابولیکی غیر فعال اند و در حال رشد و نمو نیستند، نسبت به دارو مقاومند. از آنجایی که بیشترین فعالیت متابولیکی باکتری ها در فاز لگاریتمی رشد آن ها مشاهده می شود، این ارگانیسم ها بیشترین حساسیت خود را به آنتی بیوتیک ها در این فاز نشان می دهند. به عنوان مثال باکتری هایی که به مدت چند سال پس از عفونت در نسوج زنده باقی می مانند، و در عین حال توسط سیستم ایمنی میزبان محدود شده و تکثیر نمی یابند، در مقابل درمان مقاوم بوده و نمی توان آن ها را با دارو ریشه کن کرد. چنان چه این ارگانیسم ها، مثلا به دنبال مهار و تضعیف ایمنی سلولی شروع به تکثیر کنند، به همان داروها حساس خواهند بود (۲۵).

منشاء ژنتیکی مقاومت:

الگوهای ژنتیکی مقاومت دارویی شامل:

- **دارای منشاء کروموزومی:** این امر به صورت موتاسیون خودبه خودی بر روی ژن های کنترل کننده ی حساسیت باکتری روی می دهد. این گونه مقاومت، معمولا بر اساس تغییر در گیرنده های دارو در باکتری عمل می کند.
- **دارای منشاء خارج کروموزومی:** در این حالت فاکتور های مقاومت غالبا" از طریق عناصر سیار ژنتیکی انتقال می یابد. این فاکتورهای مقاومت به طور شاخص از طریق پلاسمیدهای کنژوگه، که حاوی ژن های مقاومت نسبت به یک یا چند داروی ضد میکروبی هستند، و طی مکانیسم های مختلف از جمله کنژوگاسیون از یک باکتری به باکتری دیگر منتقل می شوند. ژن های موجود بر روی پلاسمیدها، معمولا بر اساس تولید آنزیم های غیر فعال کننده ی دارو عمل می کنند. در سال های اخیر به خوبی مشخص شده است که طیف عمده ای از این الگوهای

مقاومت به واسطه کسب سایر عناصر ژنتیکی سیار حاوی ژن های مقاوم نیز ایجاد می شوند ، که به واسطه این پدیده ژن های مقاومت دارویی از طریق انتقال افقی به سایر گونه ها و حتی جنس های دیگر باکتریایی انتقال می یابد. این عناصر سیار ژنتیکی غالبا از جنس ترانسپوزون، فاژ و اینتگرون ها هستند که پتانسیل بالایی برای انتقال ژن های مقاومت دارویی نشان می دهند(۲۶).

اینتگرون ها

مطالعات اخیر حاکی از نقش قابل توجه و مهم اینتگرون ها در انتشار ژن های مقاوم در بخش های مختلف بیمارستانی است ، که غالبا این ژن های مقاومت بر روی کاست های ژنی مشخص قرار دارند که به سبب قابلیت اتصال این کاست ها در مجموعه های اینتگرونی طی فرایند نو ترکیبی اختصاصی در جایگاه (Site Specific Recombination) انتقال ژن های مقاوم صورت می پذیرد. ماهیت اصلی اینتگرون ها به سبب ژن اینتگراز (IntI) می باشد که کد کننده آنزیم ریکامیناز اختصاصی در جایگاه بوده و مقدمات اتصال یا جدا سازی کاست های ژنی کوچک را در جایگاه اتصال (attI) فراهم می سازد. کاست های ژنی معمولا حاوی یک ژن (غالبا ژن های مقاومت دارویی) و یک جایگاه محافظت شده به نام Att c بوده که مقدمات شناسایی اینتگراز طی فرایند اتصال و برش را فراهم می سازد ، کاست ها معمولا فاقد پروموتور بوده اما بعد از اتصال به اینتگرون از پروموتور آن جهت بیان ژن های انتقال یافته استفاده می کنند .

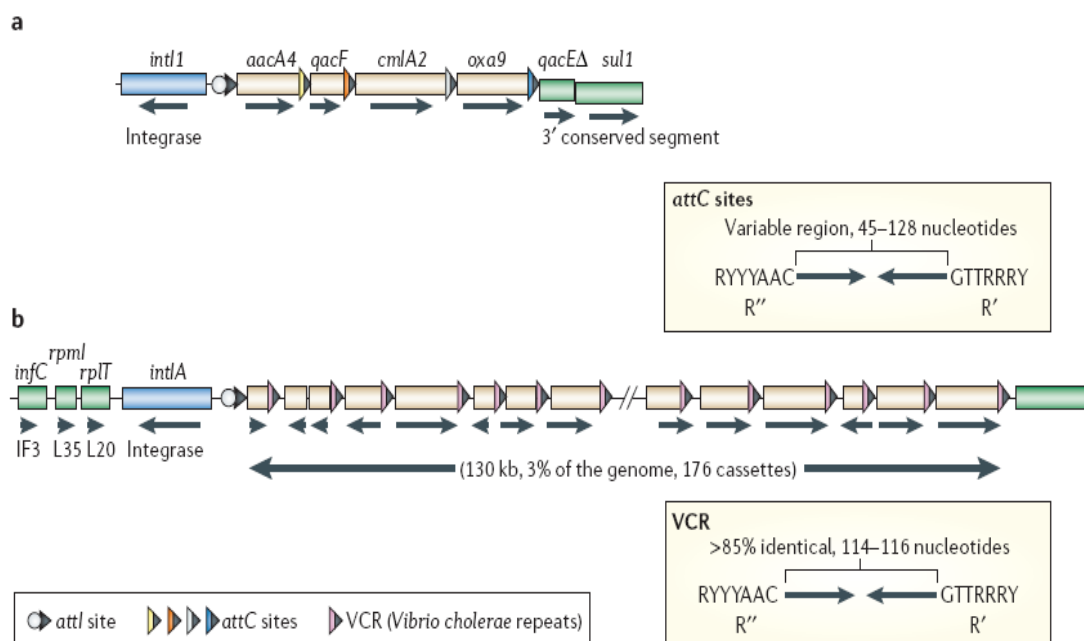


Figure 1 | **Mobile integrons and superintegrons.** Structural comparison of a 'classical' mobile integron and the superintegron from *Vibrio cholerae* strain N16961. **a** | A schematic representation of the class 1 integron In40. The various resistance-gene cassettes carry different attC sites. The following antibiotic-resistance cassettes confer resistance to the following compounds: *aacA4*, aminoglycosides; *cmlA2*, chloramphenicol; *oxa9*, β -lactams; *qacF* and *qacE*, quaternary ammonium compounds. The *sul* gene, which confers resistance to sulphonamides, is not a gene cassette. **b** | A schematic representation of the chromosomal superintegron in *V. cholerae*; the open reading frames are separated by highly homologous sequences, the *V. cholerae* repeats (VCRs). *infC*, encodes translation initiation factor IF3; *rpml* and *rplT* encode ribosomal proteins L35 and L20, respectively.

تصویر ۱-۱ : نمونه ای از ساختار شماتیک اینتگرون کلاس یک (۲۷)

گزارشات مختلف از اقصی نقاط جهان حاکی از حضور اینتگرون ها در طیف وسیعی از از باکتری ها است و تا کنون بیش از ۸ کلاس از آن ها شناسایی شده است. در مطالعاتی که الگوهای ژنتیکی مقاومت دارویی را مورد بررسی قرار دادند کلاس های اینتگرونی ۳ و ۲،۱ (به ویژه اینتگرون کلاس یک) از اهمیت بالایی در انتقال ژن های مقاومت برخوردار بودند. در این مطالعات ارتباط معنی داری بین حضور این کلاس های اینتگرونی با مقاومت به کلاس های آنتی بیوتیکی عمده مصرفی در بیمارستان ها اثبات شده است (۲۷).

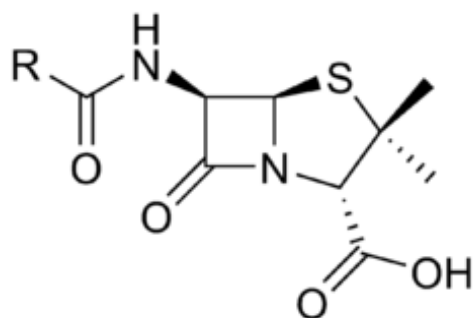
کاست های ژنی که در این اینتگرون ها شناسایی شده است غالباً متغییر بوده به طوری که تاکنون بیش از ۶۰ کاست ژنی متفاوت تا به حال شناسایی شده اند که مقدمات مقاومت به آنتی بیوتیک های مهمی از جمله آمینوگلیکوزیدها ، پنی سیلین ها ، سفالوسپورین ها ، کرباپنم ها ، تریمتوپریم ها ، کلرامفنیکل ، ریفامپین و اریترومایسین و ترکیب های چهار گانه آمونیومی را فراهم می سازد. جالب است که مطالعات زیادی ، اینتگرونهای حاوی بیش از یک کاست ژنی را گزارش کرده اند که ایزوله های باکتری های حاوی آن ها را مستعد داشتن الگوی مقاومت دارویی چندگانه (Multiple Antibiotic Resistance) می کند (۲۸).

به ویژه در خصوص بتالاکتامازها، وجود ژنهای مقاومت کلاسهای ملکولی A طبقه بندی امبلر(بجز TEM و SHV) و کلاس B و D که مقدمات مقاومت به طیف وسیعی از داروهای بتالاکتام را فراهم می کنند بر روی کلاس های مختلف اینتگرونی به ویژه اینتگرون کلاس یک اثبات شده است.

بنا به اهمیت داروهای بتالاکتام که به ویژه از نظر اثر بخشی و طیف وسیعی از میکروارگانیسم های بیمارستانی و همچنین اهمیت اینتگرون ها در انتقال کاست های ژنی مقاومت به این داروها ابتدا این داروها به شرح ذیل بحث می شوند.

داروهای بتالاکتام به چهار گروه عمده تقسیم می شوند که عبارتند از:

• **پنی سیلین های طبیعی:** مثل پنی سیلین G و V که از طریق مهار ترانس پیتیداز از سنتز دیواره سلولی در باکتریها ممانعت می کنند. تمامی پنی سیلین ها، دارای یک حلقه تiazolidine متصل به یک حلقه بتالاکتام (که خود دارای یک گروه آمین نوع دوم - RNH می باشد) هستند. استحکام ساختاری ۶- آمینو پنی سیلانیک اسید، جهت فعالیت بیولوژیک مولکول آن، ضروری است. اگر این حلقه بتالاکتام، توسط بتالاکتامازهای باکتریال تخریب شود، فرآورده حاصل فاقد فعالیت ضدباکتریایی خواهد بود (۱،۲۹).



تصویر ۱-۲ مربوط به هسته ی پنی سیلین

(عضو شاخص خانواده ی بتالاکتام ها) (۱)

- پنی سیلین های نیمه صناعی: پنی سیلین های مقاوم به پنی سیلیناز، پنی سیلین

های وسیع الطیف و پنی سیلین های ضد سودوموناس (۱).

- سفالوسپورین ها و سفامايسين ها:

این دسته از داروها از بزرگترین خانواده داروهای بتالاکتام و از مشتقات نیمه صناعی ۷- آمینو سفالوسپورانیک می باشند. سفالوسپورین ها نسبت به بسیاری از بتالاکتامهای باکتریایی، از پنی سیلین پایدارترند، لذا عمدتاً طیف فعالیت گسترده تری دارند. فعالیت ضد میکروبی ذاتی سفالوسپورین های طبیعی، اندک است و اتصال گروههای مختلف R1 و R2، داروهای با اثرات درمانی خوب و اثرات سمی کم بوجود آورده است.

سفالوسپورین ها از لحاظ مکانیسم عمل شبیه پنی سیلین ها عمل می کنند. درواقع بعد از اتصال به PBP ها با مهار عمل ترانس پپتیداسیون، از سنتز دیواره سلولی باکتریها ممانعت می کنند و سرانجام با فعال شدن آنزیم های اتولیتیک سلول باکتری از بین خواهد رفت. این دسته از

داروهای بتالاکتام را براساس طیف اثر بر باکتری های گرم منفی به چهار دسته تقسیم بندی می کنند(۱).

نسل اول سفالوسپورین ها

این دسته از داروها غالباً بر باکتریهای گرم مثبت مؤثرند و اثرشان بر باکتریهای گرم منفی محدود به باکتریهای روده نظیر اشرشیاکلی، کلبسیلا و پروتئوس میرابیلیس می باشند. هرچند این داروها نسبتاً وسیع الطیف و غیرسمی اند ولی به عنوان داروی انتخابی، در درمان هیچ عفونتی به کار نمی روند. از جمله این داروها عبارتند از: سفادروکسیل، سفازولین، سفالکسین، سفالوتین، سفاپیرین، سفرادین(۱).

نسل دوم سفالوسپورین ها

این دسته از داروها برعلیه باکتری های گرم منفی اثر بیشتری داشته و بر روی باکتریهای گرم مثبت اثری مشابه سفالوسپورین های نسل اول دارند؛ نظیر سفاکلور، سفامندول، سفونیسید، سفپروزیل، لوراکایف، سفوروکسیم، سفورانید و سفامایسین ها که شامل سفوکسیتین، ممفتازول و سفوتتان اند؛ که غالباً برعلیه باکتری بی هوازی فعالیت دارند. هرچند که سفالوسپورین های نسل دوم، ممکن است که در شرایط آزمایشگاهی، علیه گونه های کلبسیلا و سیتروباکتر موثر باشند؛ ولی عموماً در درمان عفونت های ایجاد شده علیه این ارگانیسم ها به کار نمی روند. زیرا موتانت های مقاوم این باکتریها با تولید یک بتالاکتاماز کروموزومی، این داروها و همچنین سفالوسپورین های نسل سوم راهیدرولیز می نماید(۱، ۲۹).

نسل سوم سفالوسپورین ها

این دسته از داروها به علت داشتن گروههای R بزرگ و غیرمعمول، نسبت به عمل بتالاکتامازها، مقاومت شدیدی از خود نشان می دهند. این دسته از داروها، هرچند که بیشترین

طیف اثر را بر روی باکتری های گرم منفی دارند، ولی فعالیت شان علیه باکتری های گرم مثبت ناچیز است. این داروها به سبب میل ترکیبی بالا به PBP ها در باکتریها، و همچنین به سبب مقاومت خوبی که در برابر بسیاری از بتالاکتامازها از خود نشان می دهند، داروهای مناسبی هستند. از جمله این داروها عبارتند از: سفوپرازون، سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفتی زوکسیم، سفتریاکسون، سفکسیم، سفپودوکسیم پروگزتیل، سفتی بوتین و موگزالاکتام(۲۹).

نسل چهارم سفالوسپورین ها

این دسته از داروها، از نظر اثر بر باکتریهای گرم منفی، مشابه نسل سوم بوده و همچنین بر علیه باکتریهای گرم مثبت، فعالیت خوبی از خود نشان می دهند. سفپیم، نمونه ای از سفالوسپورین های نسل چهارم است. این دارو، به دلیل این که نسبت به هیدرولیز بتالاکتامازهای کروموزومی و تا حدی بتالاکتامازهای وسیع الطیف مقاوم است، جزو گروه چهارم قرار می گیرد(۳۰).

کارباپنم ها

این دسته از داروها به طریق صناعی از تینامایسین ساخته می شوند. اگرچه تینامایسین در درمان عفونت های انسانی مورد استفاده قرار نمی گیرد، یکی از مشتقات Formimidoyl آن، یعنی ایمی پنم به عنوان یکی از وسیع ترین آنتی بیوتیک های بتالاکتام، مصرف بالینی دارد. کارباپنم ها، ساختمانی دوحلقه ای، شامل یک حلقه بتالاکتام و یک حلقه غیراشباع پنج کربنه دارند، که به جای اتم کربن در موقعیت ۱ آن، اتم گوگرد قرار دارد. ایمی پنم با اتصال قوی به PBP1 و PBP2 از عمل ترانس پپتیداسیون ممانعت می کند. این داروها در برابر بسیاری از بتالاکتامازها و همچنین بتالاکتامازهای کروموزومی کلاس ۱ (که باعث تخریب سفالوسپورین های نسل سوم می گردند) مقاوم هستند. ایمنی پنم، به خوبی به سلول های گرم منفی نفوذ کرده و علیه باکتری های بی هوازی نیز موثر است. تجویز ایمنی پنم به همراه سفالوسپورین ها جایز نیست، چرا که این دارو، سبب بیان بتالاکتاماز کروموزومی کلاس ۱ می گردد. تمامی سفالوسپورین ها

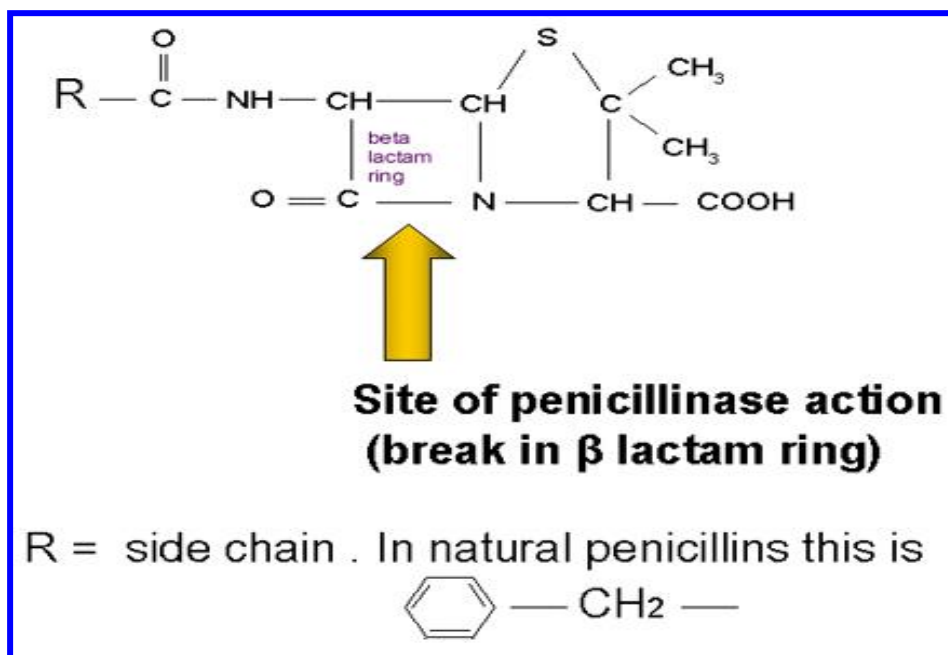
توسط بتالاکتاماز کلاس ۱ غیرفعال می شوند و اسیدکلاولانیک و سولباکتام قادر به غیرفعال کردن بتالاکتاماز کلاس ۱ به تنهایی نیستند. امروزه کرباپنم ها به عنوان داروی انتخابی در درمان بیماران مبتلا به ارگانیسم های تولید کننده ESBL به کار می روند. این داروها در برابر هیدرولیز کنندگی ESBL ها کاملاً پایدار بوده و به علت اندازه مولکولی فشرده و ساختار زئوترونیک خود به راحتی از غشاء خارجی عبور می کنند. مطالعات نشان داده که درمان با ایمی پنم در بیماران مبتلا به ارگانیسم های مولد ESBL، پیامدهای بهتری نسبت به سایر داروهای ترکیبی دارد. در مطالعه ای که اخیراً بر روی سوش های کلبسیلاپنومونیه مقاوم به چند دارو در اسکاتلند انجام شد، تنها یک ایزوله به ایمی پنم مقاوم بود. که آن هم به علت از دست دادن پروتئین های غشاء خارجی بود. کرباپنم های جدید مانند ارتاپنم و ایمی پنم در درمان ارگانیسم های تولید کننده ESBL مفید است. مطالعات انجام شده، حاکی از آن است که ارتاپنم ها در شرایط آزمایشگاهی فعالیت خوبی را علیه ارگانیسم های تولید کننده ESBL نشان می دهند، هر چند با ازدست دادن پورین، حساسیت این داروها می تواند کاهش یابد (۲۹، ۳۱)

مونوباکتام ها:

آزترونام مهمترین داروی این خانواده است. این داروها به واسطه داشتن ساختار تک حلقه ای، مشخص می شوند. آزترونام، اولین مونوباکتامي است که در سال ۱۹۹۸ در طب نوزادان توسط USFDA مجوز استفاده را دریافت کرد.

این داروها باعث مهار ساخت دیواره سلولی باکتریها می شوند. مکانیسم عمل این دارو شبیه پنی سیلین و سفالوسپورین بوده و ترجیحاً با اتصال به PBP-3 در باکتریها گرم منفی باعث لیز و مرگشان خواهد شد. تمایل آزترونام برای PBP در باکتریهای گرم مثبت و بی هوازی بسیار ناچیز است. در مقایسه با ایمی پنم، آزترونام طیف ضد میکروبی محدودی دارد. در مجاورت آزترونام، باکتریهای گرم منفی ابتدا به شکل رشته های طویل درآمده و سپس از میان خواهند رفت. هرچند

این داروها در برابر خواص هیدرولیزکنندگی بسیاری از بتالاکتام‌های کروموزومی یا پلاسمیدی مقاومند، ولی مقاومت خود را در برابر بتالاکتام‌های SHV-2 و TEM-1, TEM-5 TEM-3 از دست می دهند(۲۹).



تصویر ۱-۳ محل اثر آنزیم بتالاکتاماز روی حلقه ی بتالاکتام(۱)

چنان که اشاره شد، برخی ژن های ایجاد کننده ی مقاومت، ترکیباتی تولید می کنند که بتالاکتاماز نامیده می شوند و قادر به تجزیه بتالاکتام ها می باشند، و بنابراین، باکتریهای حامل چنین ژن هایی، در حضور آنتی بیوتیک های بتالاکتام از بین نمی روند. به عبارت بهتر، بتالاکتامازها، آنزیم هایی هستند که سبب تخریب حلقه ی بتالاکتام موجود در آنتی بیوتیک های گروه بتالاکتام و هیدرولیز آن ها می شوند. این آنزیم ها منشاء پلاسمیدی داشته و به سبب انتقال فاکتور مقاومت به سایر گونه ها، حتی دیگر جنس های دخیل در عفونت های بیمارستانی، در سال

های اخیر مورد توجه بسیاری بوده اند. به عنوان نمونه از چنین ژن هایی، می توان به ژن های SHV, PER, CTX و TEM اشاره کرد.

نکته این جاست که بروز جهش در این ژن ها، و به دنبال آن جایگزینی اسیدهای آمینه در محصول این ژن ها، به ویژه در جایگاه فعال آن ها، سبب پیدایش بتالاکتمازهایی با طیف اثر وسیع روی انواع آنتی بیوتیک های بتالاکتام، از قبیل پنی سیلین ها و سفالوسپورین های نسل اول، دوم، سوم، چهارم (که دارای زنجیره ی جانبی اکسی ایمینو هستند)، مانند: سفتازیدیم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون، و سفپیم) و منوباکتام ها (مثل آزترونام) می شود. به چنین بتالاکتمازهایی، بتالاکتمازهای وسیع الطیف (ESBLs)، اطلاق میشود. (۲۹-۳۱)

اصول طبقه بندی بتالاکتمازها:

از سال ۱۹۷۰، چندین معیار، جهت طبقه بندی عملکرد بتالاکتمازها استفاده می شود، از جمله طیف ضد میکروبی، پروفایل سوبسترا، پروفایل مهارکنندگی آنزیم ها، شارژ آنزیم (PI)، میزان هیدرولیزکنندگی (Vmax)، تمایل اتصال (KM)، Isoelectric focusing، وزن مولکولی پروتئین و محتویات اسید آمینه ای آنها (۳۲).

در سال ۱۹۷۳، طرح طبقه بندی بتالاکتمازها برای اولین بار توسط Sykes و Richmond ارائه داده شد، که براساس پروفایل سوبسترا، حساسیت به مهار کننده ها و Isoelectric focusing یکسانی اندازه و خواص ایمونولوژیکی، بتالاکتمازها را به ۵ گروه عمده (I-V) تقسیم کرد. البته این طرح طبقه بندی قبل از پیدایش ESBL ها مطرح شد. بنابراین با طرح این طبقه بندی افتراق بین ESBL ها و آنزیم های والد اولیه شان یعنی TEM-1, TEM-2 و SHV-1 ممکن نبود.

در سال ۱۹۹۵، Bush-Jacoby بتالاکتامازها را براساس پروفایل سوبسترا، پروفایل ممانعت کنندگی و خصوصیات فیزیکی نظیر وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک به ۴ گروه (۱-۴) و زیر گروه (a-f) مطابق جدول ۲ طبقه بندی کردند (۳۲).

- گروه ۱: شامل سفالوسپورینازهایی هستند که توسط کلاولانیک اسید مهار نمی شوند. این گروه به کلاس C تعلق دارند.

- گروه ۲: شامل پنی سیلینازها و سفالوسپورینازها و یا هر دو می باشند که توسط کلاولانیک اسید مهار می شوند. این گروه مشابه کلاس A و D مولکولی می باشند، که شامل ژنهای اصلی TEM و SHV هستند، ولی به علت تعدد بتالاکتامازهای مشتق شده از این آنزیم ها، این گروه به ۲ زیر گروه عمده تقسیم می شوند: ۲a و ۲b. زیر گروه ۲a، شامل تمام پنی سیلینازها می باشد، در حالی که زیر گروه ۲b بتالاکتامازهای وسیع الطیف را شامل می شوند؛ بدین معنی که آنها قادرند پنی سیلین ها و سفالوسپورین ها را به صورت یکسان هیدرولیز نمایند. به همین دلیل زیر گونه های زیر از زیرگروه 2b مشتق شده اند که عبارتند از:

✓ زیرگروه ۲be: که شامل بتالاکتامازهای وسیع الطیفی (ESBLs) می باشند که قادرند که نسل سوم سفالوسپورین ها (از جمله سفتازیدیم، سفوتاکسیم و سفپودوکسیم) و همچنین مونوباکتام ها (آزترونام) را غیرفعال سازند.

✓ زیرگروه ۲br: شامل بتالاکتامازهایی با تمایل کمتر به کلاولانیک اسید و سولباکتام می باشند. این آنزیم ها را آنزیم های مشتق شده از TEM و مقاوم به مهارکننده می نامند. هرچند این آنزیم ها هنوز به تازوباکتام ها حساس مانده اند.

✓ زیر گروه ۲C: این آنزیم ها از گروه ۲b جدا شده اند، زیرا کاربونی سیلین ها را بیشتر از بنزیل پنی سیلین ها غیرفعال می کنند. هرچند اثر یکسانی بر کلوگراسیلین دارند.

✓ زیر گروه ۲d: آنزیم هایی هستند که کلوگراسیلین ها را بیشتر از بنزیل پنی سیلین ها غیرفعال می سازند، در حالی که اثر یکسانی در برابر کاربونی سیلین ها دارند. این آنزیم ها به طور ضعیفی توسط کلاولانیک اسید مهار می شوند . برخی از آنها از نوع ESBL ها هستند.

✓ زیر گروه ۲e: سفالوسپورینازهایی هستند که قادرند مونوباکتام ها را نیز هیدرولیز نمایند. این آنزیم ها توسط کلاولانیک اسید مهار می شوند.

✓ زیر گروه ۲f: این آنزیم ها سفالوسپورینازهای دارای جایگاه فعال سرین هستند در حالی که سفالوسپورینازهای دارای جایگاه فعال روی (Zn) در گروه ۳ قرار می گیرند.

• گروه ۳ شامل بتالاکتامازهای برپایه جایگاه فعال روی می باشند، که مشابه کلاس B مولکولی هستند. این آنزیم ها قادرند که پنی سیلین ها و سفالوسپورین ها و کرباپنم ها را هیدرولیز نمایند. بنابراین کرباپنم ها توسط هر دو گروه ۲f (مکانیسم بر پایه سرین) و گروه ۳ (مکانیسم بر پایه روی) مهار می شوند.

• گروه ۴ شامل پنی سیلینازهایی هستند که توسط کلاولانیک اسید مهار می شوند؛ در طبقه بندی مولکولی برای آنها مشابهی نیافته اند (۳۲).

جدول ۱-۲: طبقه بندی بتالاكتامازها (۳۲)

Table 1. Selected β -Lactamases of Gram-Negative Bacteria.				
β -Lactamase	Examples	Substrates	Inhibition by Clavulanic Acid*	Molecular Class
Broad-spectrum	TEM-1, TEM-2, SHV-1	Benzylpenicillin (penicillin G), aminopenicillins (amoxicillin and ampicillin), carboxypenicillins (carbenicillin and ticarcillin), ureidopenicillin (piperacillin), narrow-spectrum cephalosporins (cefazolin, cephalothin, cefamandole, cefuroxime, and others)	+++	A
	OXA family	Substrates of the broad-spectrum group plus cloxacillin, methicillin, and oxacillin	+	D
Expanded-spectrum	TEM family and SHV family	Substrates of the broad-spectrum group plus oxyimino-cephalosporins (cefotaxime, cefpodoxime, ceftazidime, and ceftriaxone) and monobactam (aztreonam)	++++	A
	Others (BES-1, GES/IBC family, PER-1, PER-2, SFO-1, TLA-1, VEB-1, and VEB-2)	Same as for TEM family and SHV family	++++	A
	CTX-M family	Substrates of the expanded-spectrum group plus, for some enzymes, cefepime	++++	A
	OXA family	Same as for CTX-M family	+	D
	ACC-1, ACT-1, CFE-1, CMY family, DHA-1, DHA-2, FOX family, LAT family, MIR-1, MOX-1, and MOX-2	Substrates of expanded-spectrum group plus cephamycins (cefotetan, ceftoxitin, and others)	0	C
Carbapenemase	IMP family, VIM family, GIM-1, and SPM-1	Substrates of the expanded-spectrum group plus cephamycins and carbapenems (ertapenem, imipenem, and meropenem)	0	B
	KPC-1, KPC-2, and KPC-3	Same as for IMP family, VIM family, GIM-1, and SPM-1	+++	A
	OXA-23, OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-27, OXA-40, and OXA-48	Same as for IMP family, VIM family, GIM-1, and SPM-1	+	D

* Plus signs denote relative sensitivity to inhibition.

اما ارتباطات اساسی آنزیم های بتالاكتام به بهترین نحو در طبقه بندی Ambler آمده است، که بر پایه تشابه توالی اسید آمینه ها، به جای خواص فنوتیپی (در سیستم طبقه بندی Bush-Jacoby پایه ریزی شده اند.

مطابق طبقه بندی Ambler، بتالاكتامازها در چهار کلاس مولکولی تکاملی مجزا، با سکانس موتایفی جداگانه برای هر کدام طبقه بندی شده اند. کلاس های A، C و D دارای اسید آمینه سرین در جایگاه فعال خود هستند و این در حالی است که کلاس B یا متالوبتالاكتامازها برای فعالیت به روی وابسته اند. اکثر ESBL ها به کلاس مولکولی A و D، در طبقه بندی Ambler، تعلق دارند که به واسطه داشتن جایگاه فعال سرین مشخص می شوند. ESBL های مشتق از SHV و TEM به آنزیم های کلاس A تعلق داشته و این در حالی است که ESBL های مشتق از OXA به کلاس مولکولی D (اگزاسیلینازها) تعلق دارند (۳۳، ۳۴).

چنان که گفته شد، آنزیم های بتالاكتاماز، طبق طبقه بندی Ambler به ۴ گروه اصلی B، C، A و D تقسیم می شوند:

گروه A، که سبب هیدرولیز پنی سیلین و سفالوسپورین های طیف باریک می شوند، شامل TEM-1، TEM-2 و SHV-1 بوده و غالباً در باکتری هایی مانند اشرشیاکلی، و کلبسیلا پنومونیه شناسایی شده اند (۴۲-۳۵).

همانطور که در جدول ۱-۵ آمده است، بخش عمده ای از ژنهای کد کننده بتالاكتامازهای این گروه ماهیت اینتگرینی داشته و توسط این عناصر سیار ژنتیکی انتقال می یابند.

جدول ۱-۳: ژن های بتالاكتامازی کلاس ملکولی A با منشا اینتگرون (۵۰)

Table 1

Ambler class A, integron-located β -lactamases reported from various Gram-negative bacterial species

β -Lactamase	Host species	Origin	Reference
VEB-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Vietnam	[9]
	<i>Escherichia coli</i>	Vietnam	[9]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	France	[12]
	<i>Citrobacter freundii</i>	Thailand	[13]
VEB-1a	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kuwait	[14]
VEB-1b	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kuwait	[14]
VEB-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Thailand	[15]
GES-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	French Guiana	[18]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	France	[56]
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ^a	Portugal	[60]
GES-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	South Africa	[10,11]
IBC-1	<i>Enterobacter cloacae</i>	Greece	[16]
IBC-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Greece	[17]
CTX-M-2	<i>Salmonella enterica</i>	Argentina	[19]
	<i>Proteus mirabilis</i>	Argentina	[20]
CTX-M-9	<i>Escherichia coli</i>	Spain	[21]
PSE-1	<i>Vibrio cholerae</i>	Thailand	[22]

All genes listed were found on class 1 integron structures with notable exceptions.

گروه B، شامل متالوبتالاكتامازهای (MBLS) وابسته به روی (Zn) می باشند که قادر به هیدرولیز کارباپنم ها بوده و در باکتری هایی مانند سودوموناس آئروژینوزا گزارش شده اند. اکثر ژنهای کد کننده این آنزیم ها نیز ماهیت اینتگرونی داشته و توسط آنها انتقال می یابند. بخشی از ژنهای بتالاكتامازی گروه B با منشا اینتگرونی در جدول ۱-۳ آمده است (۴۳).

جدول ۱-۴: ژن های بتالاکتامازی کلاس ملکولی B با منشا اینتگرون (۵۰)

Ambler class B, integron-located β -lactamases reported from various Gram-negative bacterial species

β -Lactamase	Host species	Origin	Reference
IMP-1	<i>Serratia marcescens</i> ^a	Japan	[23–25]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Japan	[44,45]
IMP-2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Italy	[26]
IMP-3	<i>Shigella flexneri</i>	Japan	[47,48]
IMP-4	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Hong Kong	[8]
	<i>Citrobacter youngae</i>	China	[49]
IMP-6	<i>Serratia marcescens</i>	Japan	[50]
IMP-7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Canada	[7,51]
IMP-8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Taiwan	[27]
IMP-12	<i>Pseudomonas putida</i>	Italy	[28]
VIM-1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Italy	[7]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Italy	[46]
	<i>Achromobacter xylosoxydans</i>	Italy	[29]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Greece	[52]
VIM-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	France	[53,54]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Italy	[55]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Spain	[56]

All genes listed were found on class 1 integron structures with notable exceptions.

گروه C، که از آنها می توان، AmpC بتالاکتامازها را نام برد، قادر به تجزیه ی سفومایسین ها و سفالوسپورین ها می باشند (۴۴).

و گروه D، بتالاکتامازهایی با قدرت هیدرولیز زیاد، مانند OXA، که علیه اگزاسیلین و کلوزاسیلین بوده و اسید کلاولانیک به طور ضعیف، از فعالیت آن ها جلوگیری می کند. بخشی از

بتالاکتامازهای مربوط به این کلاس همانطور که در جدول ۱-۴ آمده است ماهیت اینتگرونی دارند (۴۵-۴۹).

جدول ۱-۵: ژن های بتالاکتامازی کلاس D با منشا اینتگرون (۵۰)

Ambler class D, class 1 integron-located β -lactamases reported from various Gram-negative bacterial species

β -Lactamase	Host species	Origin	Reference
OXA-1	<i>Salmonella enterica</i>	Italy	[32]
OXA-5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	South Africa	[10,11]
OXA-9	<i>Enterobacter aerogenes</i>	France	[33]
OXA-10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Vietnam	[9]
OXA-11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Turkey	[31]
OXA-14	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Turkey	[31]
OXA-16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Turkey	[31]
OXA-19	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	France	[30]
OXA-20	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	France	[57]
OXA-28	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	France	[31]
OXA-30	<i>Escherichia coli</i>	France	[59]

تعریف آمینوگلیکوزیدها

این دسته از داروها سنتز پروتئین در باکتریها را مهار می کنند. استرپتومایسین، نئومایسین، کانامایسین، آمیکاسین، جنتامایسین و ... از مهمترین داروهای این مجموعه می باشند. این داروها از طریق مهار زیر واحد ۳۰S ریبوزومی عمل می کنند.

بروز مقاومت دارویی نسبت به این داروها عمدتاً از طریق روش های زیر صورت می پذیرد:

(۱) کاهش تمایل در گیرنده ریبوزومی

(۲) کاهش نفوذپذیری در برابر دارو و فقدان انتقال فعال به درون سلول

۳) تخریب آنزیمی دارو که شایعترین مکانیسم مقاومت به این داروها محسوب می شود. تا به امروز بیش از ۵۰ آنزیم مختلف شناسایی شده است. ژنهای کد کننده این آنزیم ها به طور معمول بر روی پلاسمیدها و سایر عناصر سیار ژنتیکی از جمله اینتگرون ها و ترانسپوزون ها قرار دارند(۵۱).

مکانیسم های مقاومت به فلوروکینولونها

فلوروکینولون ها در اوایل دهه ۱۹۷۰ عرضه شدند . در ابتدا این عوامل بیشتر جهت درمان عفونتهای ادراری مورد استفاده قرار می گرفتند. ولی بعد از آن کم کم استفاده از این عوامل ضد میکروبی وسیع تر گشت به شکلی که امروزه در درمان اکثر عفونت های مختلف از این عوامل استفاده می شود. استفاده از این عوامل در دهه ۱۹۸۰ بسیار زیاد گردید به شکلی که میزان استفاده از آن در مقایسه با سایر داروهای دیگر به مقدار قابل ملاحظه ای پیش گرفت. در اواخر همین دهه بود که اولین موارد مقاومت نسبت به این داروها گزارش گردید. در اوایل این مقاومت میزان بسیار پایینی را شامل می شد. ولی بعدها با استفاده بیشتر از این عوامل داروهایی و استفاده گسترده در درمانهای مختلف میزان مقاومت با سرعت بسیار زیادتری نسبت به قبل رو به افزایش نهاد(۵۲).

عموماً مقاومت نسبت به فلوروکینولونها در چند مکانیسم خلاصه می شود که مهمترین آنها موتاسیون های ایجاد شده در آنزیم های هدف فلوروکینولونها شامل آنزیم های DNA ژیراز و توپوایزومراز IV است. همچنین مهار تجمع و کاهش غلظت دارو در باکتریها از دیگر مکانیسم های کاهش حساسیت و ایجاد مقاومت در باکتریهای مختلف می باشد. از آنجایی که ظهور فلوروکینولونهای جدید بیشتر در درمان عفونتهای دستگاه ادراری و بیشتر عفونتهای تنفسی می باشد در نتیجه مقاومت باکتریهای ایجاد کننده این عفونتها به این عوامل ضد باکتریایی جای نگرانی بسیار دارد.(۴۰) به شکلی که مطالعات اخیر در سالهای گذشته مقاومت نسبتاً بالایی را در

نقاط مختلف دنیا نشان داده است. در حال حاضر نوعی دیگر از مقاومت به این داروها بواسطه شیوع ژن پلاسمیدی qnr گزارش می شود. این ژن ها در غالب یک پلاسمید گائزگاتیو انتقال یافته و باعث ایجاد مقاومت نسبت به کینولونها می باشد (۵۳-۵۵).

الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در بخش مراقبت ویژه (ICU)

بر اساس نتایج مطالعات مختلف در سراسر جهان مقاومت های ضد میکروبی در بیماران بستری در بخش ICU از اهمیت ویژه ای برخوردارند. این امر، عمدتاً به دنبال درمان ناکامل با آنتی بیوتیک هاست، که غالباً مقاومت های ضد میکروبی را به همراه دارد. بستری طولانی مدت در بیمارستان و نقایص درمانی آنتی بیوتیکی دوران نقاهت نیز، از عوامل اصلی افزایش الگوی مقاومت دارویی در بخش های مراقبت ویژه هستند. بیماران بستری در بخش ICU، به سبب راهکارهای تشخیصی-درمانی سریع و تهاجمی که برایشان در نظر گرفته می شود و با توجه به اینکه غالب بیماران بستری در این بخش سیستم ایمنی تضعیف شده داشته و یا از بیماری های شدید و مزمن رنج می برند، بیشتر مستعد ابتلاء به عفونت با ارگانیسم های مقاوم و کلونیز با آن هستند. فشار انتخابی استفاده از داروهای وسیع الطیف و شلوغی بیش از حد در این بخش از دیگر عوامل مهم و مشکل زا در ارائه راهکارهای صحیح کنترل عفونت محسوب می شوند. مطالعات فراوانی که بر روی ایزوله های جدا شده از بخش ICU انجام شد، نشان داد که ارتباط بسیار نزدیکی، بین استفاده قبلی از داروهای ضد میکروبی و متعاقباً مقاومت های آنتی بیوتیکی وجود دارد.

امروزه، مشکل باکتری می ناشی از سویه های مقاوم به دارو، در بخش های مختلف بیمارستان، به خصوص بخش مراقبت ویژه به طرز شگفت آوری رو به افزایش است. اکثر مطالعاتی که بر روی ایزوله های گونه های کلبسیلا مقاوم انجام شد، نشان می دهند که میزان ارگانیسم های مقاوم جدا شده از بخش ICU بیشتر از سایر بخش ها می باشد. در مجموع برای غلبه بر این مشکل، لزوم

دقت و توسعه داروهای ضد میکروبی جدید و به کارگیری ابزارهای جدید و گسترده کنترل عفونت کاملاً ضروری به نظر می رسد (۵۶).

اهمیت بالینی جداسازی اینتگرون ها :

امروزه باسیل های گرم منفی دارای اینتگرون باعث نگرانی های جدی برای پزشکان و متخصصان عفونی و کنترل عفونت شده اند. نقش این عناصر در بروز ماهیت مقاومت دارویی چندگانه و مقاومت نسبت به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک ها به ویژه آنتی بیوتیک های مصرفی در بیمارستان ها باعث مشکل شدن راهکارهای صحیح درمانی و ابزارهای کنترل عفونت شده اند. مطالعات مختلف نشان داده اند که بیماران آلوده به این ارگاناسم ها به طور معنی داری در مرگ و میر بیماران نقش دارند. لذا پزشکان بالینی باید با اهمیت این آنزیم ها از لحاظ بالینی آشنا بوده و راهکارهای لازم برای برخورد با این مشکل، و چگونگی کنترل این عفونت ها را بدانند (۵۷-۵۹).

فاکتورهای خطر در انتشار اینتگرون ها :

فشار انتخابی و استفاده گسترده از عوامل ضد میکروبی، به عنوان یک فاکتور مهم در پیدایش مقاومت های دارویی، به ویژه در بخش ICU مطرح اند. مطالعات متعددی که در این زمینه انجام شد ارتباط نزدیک بین استفاده قبلی از آنتی بیوتیک ها و متعاقب آن، پیدایش مقاومت های آنتی بیوتیکی در باکتری های گرم منفی را آشکار کرد. بستری طولانی مدت در بیمارستان، راهکارهای تهاجمی که برای بیماران بستری در این بخش در نظر گرفته می شود (نظیر لوله تراشه، کاتترهای داخل عروقی و کاتترهای ادراری)، و مواجه شدن با بیماران آلوده به ارگاناسم های دارای اینتگرون ، از دیگر عوامل ایجاد خطر در بخش ICU هستند. همچنین بیمارانی که شرایط درمانی بلندمدت برای آنها در نظر گرفته می شود، منبع خوبی برای ورود باکتری های مقاوم به بخش ICU هستند. پیگیری نکردن بیمارانی که قبلاً در چنین بخش هایی بستری بوده اند و یا کلونیز شده اند، نیز از دیگر مهمترین فاکتورهای خطر محسوب می شوند (۶۰).

روش های کنترل عفونت

محدود نمودن استفاده از آنتی بیوتیک های وسیع الطیف، معمول ترین راه کنترل شیوع ارگانیزم های دارای اینتگرون است. آلودگی زدائی محیطی، جداسازی و ایزوله کردن این بیماران، الگوی مصرف صحیح استفاده از آنتی بیوتیک ها، آلودگی زدائی بدن، استفاده از اسپری های بینی-پوودین، سازماندهی کارمندان بخش و در موارد بحرانی، تعطیلی موقت بخش، در کنترل عفونت های ناشی از ارگانیزم های دارای اینتگرون، بسیار کمک کننده اند. همچنین ایجاد پروتوکل و راهنمای استفاده صحیح از آنتی بیوتیک ها، استفاده از داروهایی با طیف اثر محدودتر و قدیمی تر، مشورت با متخصصین بیماری های عفونی و استفاده از برنامه های چرخشی آنتی بیوتیک ها و تغییر آن، استفاده از دستکش و گان، پرهیز از خود درمانی خصوصاً با آنتی بیوتیک های وسیع الطیف بتالاکتام و بالاخره ایجاد یک سیاست علمی محدود سازی استفاده از آنتی بیوتیک ها در کشور، از راهکارهای مهم کنترل عفونت، خصوصاً در بخش های مختلف بیمارستان ها به حساب می آید. در صورت امکان، بستری بیماران در بخش خصوصی و ترخیص زود هنگام آنها و محدود نمودن حرکت یا جابه جایی آنها جز در موارد ضروری و دور ریختن زباله های بالینی، داخل کیسه های مجزا برای دفع مناسب و سوزاندن آنها، از دیگر راهکارهای کنترل عفونت محسوب می شوند (۱۰).

هدف اصلی طرح :

تعیین فراوانی اینتگرون کلاس یک در گونه های کلبسیلا جدا شده از بیمارستان های شهر قزوین و تهران.

اهداف فرعی:

- تعیین فراوانی اینتگرون کلاس یک با استفاده از آزمون PCR

- تعیین ارتباط ما بین حضور اینتگرون کلاس یک و مقاومت دارویی نسبت به آنتی بیوتیک های به کار رفته در مطالعه

اهداف کاربردی:

این مطالعه ضمن شناسایی حضور اینتگرون کلاس یک در گونه های کلبسیلا جمع آوری شده از بیمارستان های شهر قزوین به بررسی ارتباط با حضور اینتگرون و بروز مقاومت دارویی نسبت به عمده داروهای مصرفی در بیمارستان ها می پردازد و که به لحاظ ماهیت سیار بودن آن عناصر ژنتیکی نتایج می تواند در کنترل و جلوگیری از انتشار بیشتر فاکتور مقاومت در بین ایزوله های بیمارستانی کلبسیلا موثر باشد.

فرضیه ها یا سؤال های پژوهش:

آیا اینتگرون کلاس یک در بین ایزوله های کلبسیلا از فراوانی بالایی برخوردار است؟

آیا ارتباط معنی داری ما بین حضور اینتگرون و مقاومت نسبت به کلاس های عمده آنتی بیوتیکی مصرفی در بیمارستان های شهر قزوین وجود دارد؟

بررسی متون: در مطالعه ای که توسط huan و همکارانش در سال ۲۰۰۷ بر روی ۲۶۶ ایزوله بالینی انترو باکتریاسه انجام شد در مجموع ۶۶ ایزوله (۳۴٪) از نظر حضور اینتگرون کلاس یک مثبت بودند در ادامه مشخص شد که ایزوله های دارای اینتگرون کلاس یک با اختلاف معنی داری نسبت به ایزوله های فاقد اینتگرون از مقاومت بالاتری نسبت به آنتی بیوتیک های سفالوسپورین ، فلوروکینولون و آمینوگلوکوزیدها برخوردار بودند(۶۱) .

Bado و همکارانش در سال ۲۰۱۰ با بررسی ایزوله های کلبسیلیاسیه مقاوم به سفالوسپورین های اکسی ایمنو و سیپروفلوکساسین جمع آوری شده از بخش مراقبت های ویژه بیمارستانهای اروگوئه از نظر حضور اینتگرون کلاس یک مشخص کردند که ۳۸ درصد از ایزوله ها از نظر حضور اینتگرون کلاس یک مثبت بودند(۶۲).

در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۱ توسط Ibrahim و همکارانش بر روی ۱۶۰ ایزوله کلبسیلیاسیه تولید کننده ESBL در مالزی انجام شد با بررسی حضور اینتگرون کلاس یک به روش PCR مشخص شد که ۶۲,۲ درصد از ایزوله های اشریشیاکلی، ۶۴,۲ درصد از ایزوله های کلبسیلا ، ۶۱,۴ درصد از ایزوله ای کلبسیلا و ۵۰ درصد از ایزوله های سیتروباکتر به ترتیب از نظر حضور اینتگرون کلاس یک مثبت بودند(۶۳).

در مطالعه ای که توسط Yan و همکارانش در سال ۲۰۱۰ بر روی ۱۱۸ ایزوله بالینی گرم منفی در شمال چین انجام شد در مجموع ۹۰ ایزوله (۷۶٪/۳) از نظر حضور اینتگرون کلاس یک مثبت بودند که مشخص شد ، ایزوله های دارای اینتگرون از مقاومت دارویی بالاتری در برابر آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدها ، کوتری موکسازول و داروهای بتالاکتام در مقایسه با ایزوله های فاقد اینتگرون برخوردار بودند(۶۴).

در مطالعه ای که توسط Mokracka و همکارانش در سال ۲۰۰۳ بر روی ۶۹ ایزوله کلبسیلا جدا شده از نمونه های بالینی از قبیل ادرار، زخم و خون در لهستان انجام شد مشخص شد که ۵۵

درصد از ایزوله ها از نظر اینتگرون کلاس یک مثبت بودند. در ادامه با بررسی بیشتر مشخص شد که ارتباط معنی داری مابین حضور اینتگرون کلاس یک و مقاومت به آمینوگلیکوزید ها، تیکارسیلین، پیراسیلین، تری متوپریم-سولفامتوکسازول و تتراسیکلین وجود داشت (۶۵).

در مطالعه دیگری که توسط Peng و همکارانش در سال ۲۰۰۷ بر روی یکی دیگر از اعضاء خانواده انتروباکتریاسه ، سراشیا مارسسنس، انجام شد از مجموع ۱۷۳ ایزوله بالینی سراشیامایسنس تولید کننده CTX-M ، ۷۰٫۵٪ از نظر حضور اینتگرون کلاس یک مثبت بودند (۶۶).

در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۳ توسط Peyse و همکارانش در چین انجام شد از مجموع ۱۹۱ ایزوله بالینی خانواده انتروباکتریاسه در بیماران بستری ، اینتگرون کلاس یک شایعترین اینتگرون جدا شده بود. در ادامه مشخص گردید که ایزوله های دارای اینتگرون نسبت به ایزوله های فاقد اینتگرون به طور معنی داری از مقاومت بالاتری نسبت به آمپی سیلین ، سفوتاکسیم و سیپروفلوکسازین برخوردار بودند (۶۷).

در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۰ توسط Bhattacharjee و همکارانش بر روی ۱۳۶ ایزوله کلبسیلا پنومونیه یکی دیگر از اعضای خانواده کلبسیلاسیه انجام شد مشخص شد که ۸۲ درصد ایزوله ها از نظر حضور اینتگرون کلاس یک مثبت بودند (۶۸).

در مطالعه ای که توسط Peymani و همکارانش در سال ۲۰۱۱ بر روی یکی دیگر از باکتری های گرم منفی دخیل در عفونت های بالینی- اسینتوباکتر بومانی- انجام شد در مجموع مشخص شد که ۸۰ درصد از ایزوله ها الگوی مقاومت دارویی چندگانه (MDR) را نشان دادند که ۹۲/۵ درصد از آنها از نظر حضور اینتگرون کلاس یک مثبت بودند. در ادامه مشخص شد که ایزوله ای دارای اینتگرون به طور معنی داری نسبت به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزید ها، کینولون ها، داروهای بتالاکتام مقاومت بالاتری نشان دادند. در این مطالعه ارتباط معنی داری بین حضور اینتگرون

کلاس یک و مقاومت به آنتی بیوتیک های آمپی سیلین و سفپودوکسیم مشاهده نشد زیرا تمامی ایزوله ها به این دو آنتی بیوتیک مقاوم بودند (۶۹).

در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۷ توسط Machado و همکارانش بر روی ایزوله های کلبسیلا یاسیه تولید کننده ESBL در پرتغال انجام شد با بررسی حضور اینتگرون های کلاس یک و دو مشخص شد که در مجموع ۲۳٪ از ایزوله های کلبسیلا کلواکه تولید کننده ESBL از نظر حضور اینتگرون کلاس یک مثبت بودند و از نظر حضور اینتگرون کلاس دو منفی گزارش شدند (۷۰).

در دیگر مطالعه ای که در سال ۲۰۰۱ توسط White و همکارانش بر روی ایزوله های کلبسیلا یاسیه جداسازی شده از بیماران مبتلا به عفونت های ادراری در استرالیا انجام شد در مجموع ۴۹٪ از ایزوله ها از ایزوله ها از نظر حضور کلاس های اینتگرونی یک، دو مثبت بودند. در ادامه مشخص شد که ارتباط معنی داری مابین حضور اینتگرون در ایزوله های مورد مطالعه و مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های استرپتومایسین، جنتامایسین، کانامایسین، توبرامایسین، کوتتری موکسازول، آمپی سیلین، کلرامفنیکل و تتراسیکلین وجود داشت (۷۱).

در مطالعه ای که توسط Dakic و همکارانش در سال ۲۰۰۷ بر روی ۷۳ ایزوله کلبسیلا یاسیه جدا شده از بیماران سرپایی مبتلا به عفونت ادراری در یونان انجام شد در مجموع ۵۰/۷٪ از ایزوله ها نسبت به بیش از سه کلاس آنتی بیوتیکی عمده مقاومت نشان داده و در واقع الگوی مقاومت دارویی چندگانه (MDR) نشان دادند. با بررسی حضور کلاس های اینتگرون به روش PCR مشخص شد که در مجموع ۱۳ ایزوله (۱۷٪/۸) از نظر حضور اینتگرون مثبت بودند. بدین ترتیب که ۹ ایزوله (۱۲٪/۳) از ایزوله ها از نظر حضور اینتگرون کلاس یک، ۲ ایزوله (۲٪/۷) از نظر حضور اینتگرون کلاس ۲ و ۲ ایزوله (۲٪/۷) از نظر حضور همزمان اینتگرون های کلاس ۱ و ۲ مثبت بودند. در ادامه مشخص شد که ارتباط کاملاً معنی داری مابین حضور اینتگرون در ایزوله های

مقاوم و مقاومت نسبت به آموکسی سیلین-کلاولانیک اسید، کوتریموکسازول، کلرامفنیکل، سیپروفلوکساسین، نورفلوکساسین، نالیدیکسیک اسید، تتراسیکلین و داکسی سیکلین وجود داشت (۷۲).

جامعه مورد مطالعه و روش نمونه گیری:

جمعیت مورد مطالعه عبارتست از ایزوله های باکتریایی جدا شده از نمونه های بیولوژیک ارسالی (نظیر: خلط، مایع آسیت، ادرار، مایع نخاع، محل زخم و ...) به آزمایشگاه میکروب شناسی بیمارستانهای شهر قزوین و تهران است.

جهت برآورد حجم نمونه از فرمول برآورد نسبت استفاده می شود. با در نظر گرفتن $\alpha=0/05$ ، شیوع اینتگرون در گونه های مقاوم کلبسیلا $P=0/5$ و دقت $0/08$ تعداد ۱۰۰ نمونه مثبت از نظر گونه های کلبسیلا در نظر گرفته میشود. ایزوله های کلبسیلا جدا سازی شده جهت انجام مراحل تحقیق در فریزر 70°C - نگهداری خواهد شد.

نوع مطالعه توصیفی بوده و معیارهای ورود به مطالعه شامل موارد زیر است :

۱- نمونه های ارسالی که از نظر رشد گونه های کلبسیلا مثبت باشد.

و معیارهای خروج از مطالعه نیز شامل موارد زیر می باشد:

۱- نمونه های ارسالی که نتیجه کشت آنها سایر باکتری های بجز گونه های کلبسیلا باشد.

۲- بیمارانی که نمونه های ارسالی آنان تکراری باشد.

نمونه برداری:

تعداد ۱۰۰ نمونه از گونه های مختلف جنس کلبسیلا، از بخش های مختلف بیمارستان های شهر قزوین و تهران از خرداد ماه سال ۹۰ تا خرداد ماه ۹۱ جمع آوری گردید. ایزوله های باکتریایی از نمونه های بالینی ادرار و کاتترهای ادراری، تراشه، خلط، خون و سایر نمونه های بالینی جمع آوری شدند. ایزوله های جداسازی شده در آزمایشگاه های بیمارستان های بر روی دو محیط پایه بلاد آگار و EMB پاساژ داده شده و به گروه میکرب شناسی و مرکز تحقیقاتی سلولی و ملکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین انتقال داده شدند و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای 35°C ، توسط آزمایش های بیوشیمیایی مربوط به شناسایی جنس کلبسیلا مورد بررسی قرار گرفتند. تست های بیوشیمیایی که برای شناسایی جنس کلبسیلا، مورد استفاده قرار گرفتند، عبارتند از:

۱. کشت بر روی محیط مک کانگی آگار
۲. رنگ آمیزی گرم
۳. انجام آزمون اکسیداز
۴. کشت بر روی محیط کلیگر ایرون آگار (KIA)
۵. آزمایش اندول (کشت بر روی محیط SIM)
۶. آزمایش متیل رد (کشت بر روی محیط MRVP)
۷. آزمایش ووگس پروسکوئر (کشت بر روی محیط MRVP)
۸. آزمایش سیترات (کشت بر روی محیط سیمون سیترات)
۹. آزمایش هیدرولیز اوره (کشت بر روی محیط اوره آگار)
۱۰. تست حرکت (کشت بر روی محیط SIM)(۲)

بعد از انجام تعیین هویت ایزوله ها به منظور نگهداری طولانی مدت باکتریها، ابتدا آنها را در ویال های حاوی محیط کشت تریپتی کیز سوی براث (TSB Broth) کشت داده و بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای 35°C ، در صورت رشد باکتری، یک یا دو قطره گلیسرول ۲۰٪ استریل به آن اضافه کرده و سپس تا زمان انجام تست های مطالعه در فریزر 20°C - نگهداری شدند.

تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی به روش Disk Agar Diffusion

برای انجام آزمون از دستورالعمل موسسه بین المللی استانداردهای آزمایشگاهی (CLSI) استفاده شد و به شرح ذیل انجام شد (۶۸).

۱- ابتدا محیط مولر هینتون آگار تهیه شد و pH آن بین ۷/۲ تا ۷/۴ تنظیم گردید. این پلیت ها، برای کنترل آلودگی به مدت ۲۴ ساعت در دمای 35°C انکوبه شدند.

۲- در مرحله بعد، ظروف حاوی دیسک های آنتی بیوتیک جنتامایسین، آموکسی سیلین / کلاولانیک اسید، پیراسیلین / تازوباکتام، تیکارسیلین / کلاونیک اسید، سفپییم، سفوتاکسیم، سفتریاکسون، سفتازیدیم، سفپودوکسیم، آزترونام، ایمپینم، مروپنم، سیپروفلوکساسین، پیراسیلین، نورفلوکسازین، گتی فلوکسازین، نیتروفرانتوئین، تری متوپریم- سولفومتوکسازول، تیگسیکلین برای انجام آزمون، از فریزر 20°C - (نگهداری بلند مدت) به یخچال 4°C (نگهداری کوتاه مدت) انتقال داده شدند. چند دقیقه قبل از انجام تست نیز ظروف حاوی دیسک ها در محیط آزمایشگاه قرار گرفتند تا به دمای اتاق برسند. دیسک های آنتی بیوتیکی از شرکت MAST انگلستان خریداری شدند.

۳- در مرحله بعد سوسپانسیون میکروبی استاندارد جهت انجام آزمون تهیه شد. از آن جا که برای تهیه سوسپانسیون، از سویه هایی که بیش از ۲۴ ساعت از کشت آن ها نگذشته باشد، استفاده می شود، لذا نمونه ها یک روز قبل از انجام آزمایش، بر روی محیط ژلوز

ساده کشت داده شدند. سپس در دمای 35°C به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. میزانی از کلونی را به لوله حاوی ۲ ml سرم فیزیولوژی استریل انتقال داده و بعد از مخلوط کردن با میکسر، سوسپانسیونی به دست آمد که غلظت باکتری در آن، برابر با غلظت نیم مک فارلند بود.

۴- با استفاده از یک سوآپ کتان استریل سوسپانسیون را بر روی محیط مولر هینتون آگار تهیه شده به روش چمنی پخش کردیم. ۱۵ دقیقه پس از تلقیح سوسپانسیون دیسک های آنتی بیوتیکی فوق الذکر را که به دمای اتاق رسیده بودند، بر روی پلیت به فاصله حداقل ۱ cm از یکدیگر قرار دادیم.

۵- پس از دیسک گذاری، پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای 35°C انکوبه شدند. سپس با استفاده از خط کش، قطر هاله عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه گیری و نتایج مربوطه در فرم های تهیه شده یادداشت شدند.

در این آزمون از سویه کنترل *E.coli* ATCC 25922 جهت کنترل انجام آزمون استفاده گردید.

بررسی ملکولی شیوع اینتگرون کلاس یک

برای تعیین شیوع اینتگرون کلاس یک از آزمایش واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) استفاده می کنیم. در این روش از پرایمر مخصوص ژن داخلی اینتگرون کلاس یک استفاده شد که با تکثیر ژن مورد نظر و نهایتاً الکتروفورز محصولات بر روی ژل آگارز حضور و یا عدم حضور آن مشخص خواهد شد.

استخراج DNA

مراحل استخراج DNA از سویه های تولید کننده ESBL با استفاده از روش Boiling به شرح زیر انجام شد:

۱. ابتدا ۳ تا ۵ کلنی از هر نمونه را داخل ویال اپندورف ۱/۵ ml حاوی ۲۰۰ μ l آب مقطر استریل حل می کنیم.
۲. با استفاده از شیکر، آنقدر نمونه ها را shake می کنیم تا اینکه کاملاً حل شود.
۳. ویال ها را به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه، داخل بن ماری جوش (100°C)، قرار می دهیم؛ به طوری که سطح آب جوش، دوسوم ویال را در برگیرد.
۴. در این مرحله، ویال ها را به مدت ۱۰-۵ دقیقه، با دور ۱۴۰۰۰، سانتریفوژ می کنیم. که البته در این مرحله از سانتریفوژ اپندورف استفاده کردیم.
۵. محلول رویی (سوپرناتانت) ویالها، برای انجام واکنش PCR به اپندورف استریل منتقل شد.
۶. در این مرحله پس از انجام استخراج، برای اطمینان از وجود DNA توتال، از دستگاه نانودراپ در دو طول موج ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر استفاده شد.

آماده سازی پرایمرها:

۱. ابتدا توالی پرایمرها جهت ساخت تحویل شرکت دانمارکی شد. پرایمرها پس از طراحی به صورت لیوفیلیزه دریافت شدند. برای تهیه محلول ذخیره برطبق دستورالعمل (برگه آنالیز) همراه پرایمر عمل شد.

۲. توالی پرایمرها به شرح ذیل استفاده شد:

IntF, 5'-ATCATCGTCGTAGAGACGTCGG

IntR, 5'-GTCAAGGTTCTGGACCAGTTGC (69)

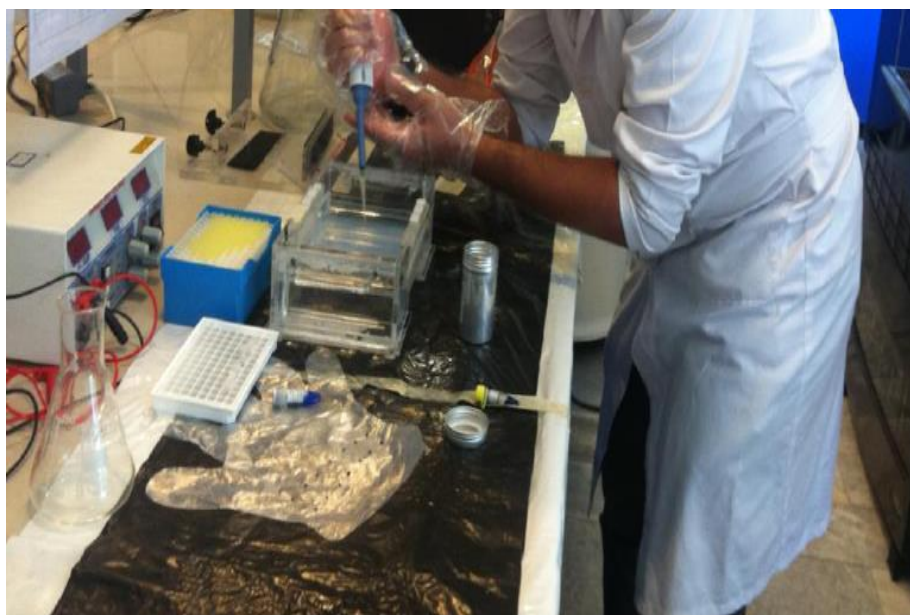
۳. در مرحله بعد، ویالهای حاوی پرایمر، به مدت ۰/۵ ساعت، در دمای 37°C قرار گرفتند.

۴. در این مرحله محلول استوک $100\mu\text{mol}$ تهیه و سپس در دمای -20°C نگهداری شدند.

۵. بسته به کار روزانه برای تهیه محلول کار پرایمرهای با غلظت $10\mu\text{mol}$ از هر دو رشته ژن تهیه و برای هر سری از واکنش های PCR استفاده شد.

انجام آزمون PCR

در این مرحله ابتدا Maternix تهیه شد (جدول ۳-۱). سپس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر و شناسایی ژن اینتگرون کلاس یک صورت گرفت. برای انجام واکنش PCR، حجم نهایی هر واکنش، $25\mu\text{L}$ میکرولیتری بود. برای به دست آوردن بهترین مقدار از ترکیبات مورد استفاده (مثل MgCl_2)، گرادیانی از مقادیر مختلف این ترکیبات، طی چند واکنش مختلف PCR انجام شد.



تصویر ۳-۱: انجام الکتروفورز محصول PCR

جدول ۱-۳ مقادیر بهینه برای تهیه master mix یک واکنش PCR

ترکیب	حجم (میکرولیتتر)
DNTP mix 10 mmol	۲
PCR Buffer 10 X	۱۰
Mgcl ₂ 50 mmol	۳
D.H ₂ O	۷۳

آماده سازی واکنش PCR :

با در نظر گرفتن حجم نهایی هر واکنش PCR که ۲۵ میکرولیتر بود، حجم پرایمرها، DNA الگو و آنزیم پلی مراز که باید به master mix اضافه شوند به شرح ذیل در جدول ۲-۳ آمده است.

جدول ۲-۳: مواد ملکولی مورد نیاز جهت انجام یک واکنش PCR

ترکیب	حجم (میکرولیتتر)
Master mix	۲۲
DNA Template	۱
Primer F	1
Primer R	1
Taq pol 5 u/ μ l	0/25

برنامه ریزی دستگاه ترموسایکلر (Thermocycler):

پس از قرار دادن ویال ها در دستگاه ترموسایکلر، شرایط دمایی مختلف و زمان های آن ها در یک واکنش PCR برطبق جدول زیر اجرا گردید.

جدول ۳-۳: شرایط برنامه ریزی دستگاه ترموسایکلر در یک واکنش PCR

	دما(سانتی گراد)	زمان
First denaturation	۹۵	5 min
Cycle(30)	۹۵	1 min
	۵۵	۳۰ sec
	۷۲	1 min
Final extention	۷۲	10 min

الکتروفورز محصولات PCR

برای انجام الکتروفورز، روی محصولات حاصل از PCR از ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. میزان ۱ gr پودر آگارز را در ۱۰۰ cc بافر TBE 1X، حل کرده و بعد از حرارت دادن و خنک شدن به میزان 1 میکرولیتر (10 µg/ml) سایبرگرین (برای رنگ آمیزی قطعات DNA) به آن اضافه کردیم. پس از مخلوط کردن، محلول را داخل قالب ریخته و پس از بسته شدن ژل، آن را از قالب خارج و به داخل تانک الکتروفورز انتقال دادیم. مقدار ۷ میکرولیتر از محصول PCR را با ۳

میکرولیتتر 6 X loading Buffer مخلوط کرده و در داخل چاهک های ژل برای الکتروفورز قرار دادیم. برای انجام الکتروفورز، ولتاژ روی ۱۰۰ ولت، تنظیم گردید، وقتی نمونه، سه چهارم طول ژل را طی کرد، ژل از تانک خارج و با لامپ UV مشاهده شد. در صورت مناسب بودن باندهای حاصل از الکتروفورز، ژل را با دستگاه UVP مورد مشاهده قرار داده و از تصویر ژل مربوطه عکس تهیه کردیم.

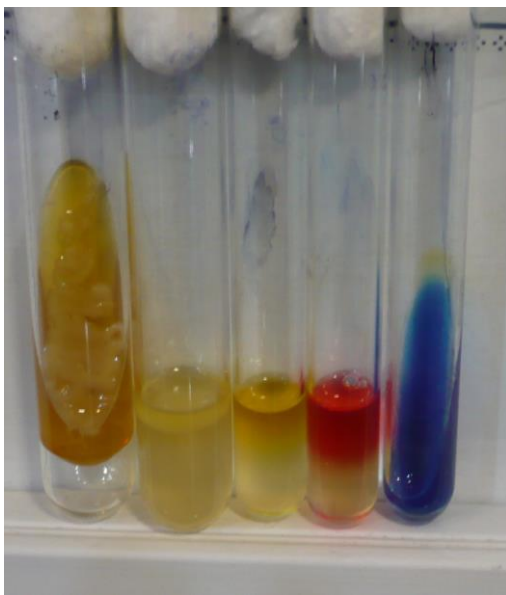
کنترل کیفی

برای اطمینان از صحت انجام آزمایش، از سویه کنترل اسپینتوباکتر بومانی تأیید شده حاوی اینتگرون کلاس یک به عنوان کنترل مثبت و اشرشیاکلی ۲۵۹۲۲ به عنوان کنترل منفی استفاده شد. همچنین برای کنترل انجام آزمون از میکروتیوب های حاوی مواد واکنش بدون DNA الگو استفاده شد.

بررسی ارتباط بین حضور اینتگرون و مقاومت آنتی بیوتیکی:

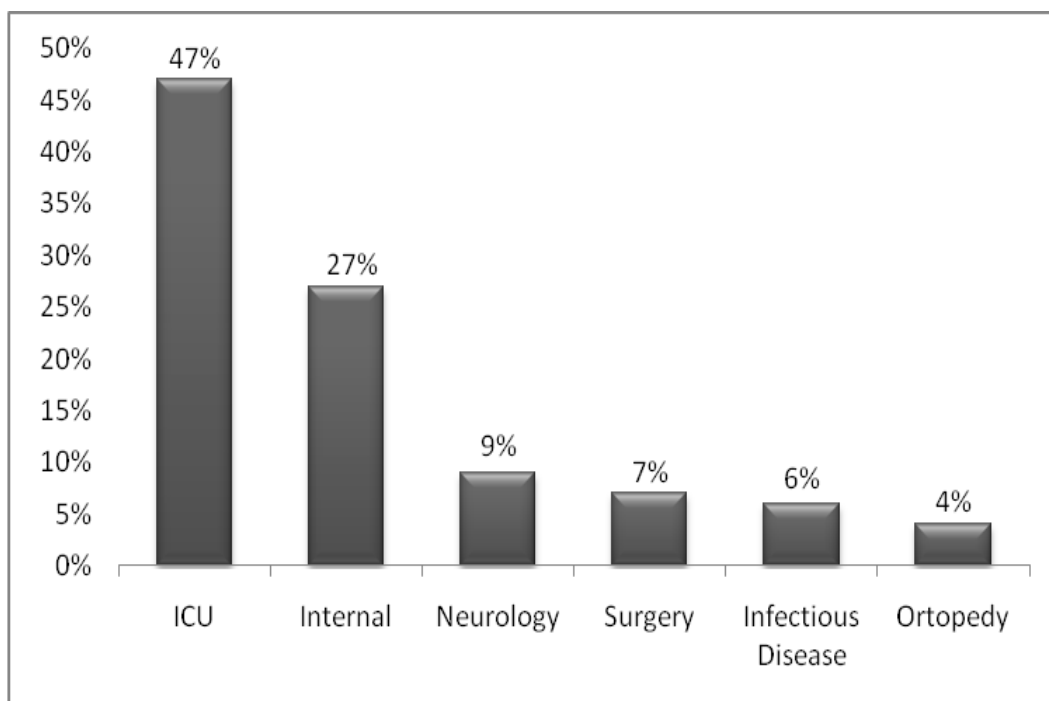
در ادامه این ارتباط با استفاده از آزمون مجذور کالی دو ارتباط بالینی حضور اینتگرون و مقاومت به داروهای به کار رفته با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۶ در مطالعه مورد بررسی قرار گرفت. مقدار P value کمتر از ۰,۰۵ از لحاظ آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

در این مطالعه ۱۰۰ ایزوله از گونه های کلبسیلا پس از انجام تست های استاندارد آزمایشگاهی و میکرب شناسی جمع آوری شدند (تصویر ۳-۱). در انجام آزمون اکسیداز از سویه های استاندارد *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (کنترل مثبت) و *E. coli* ATCC 25922 (کنترل منفی) استفاده شد.



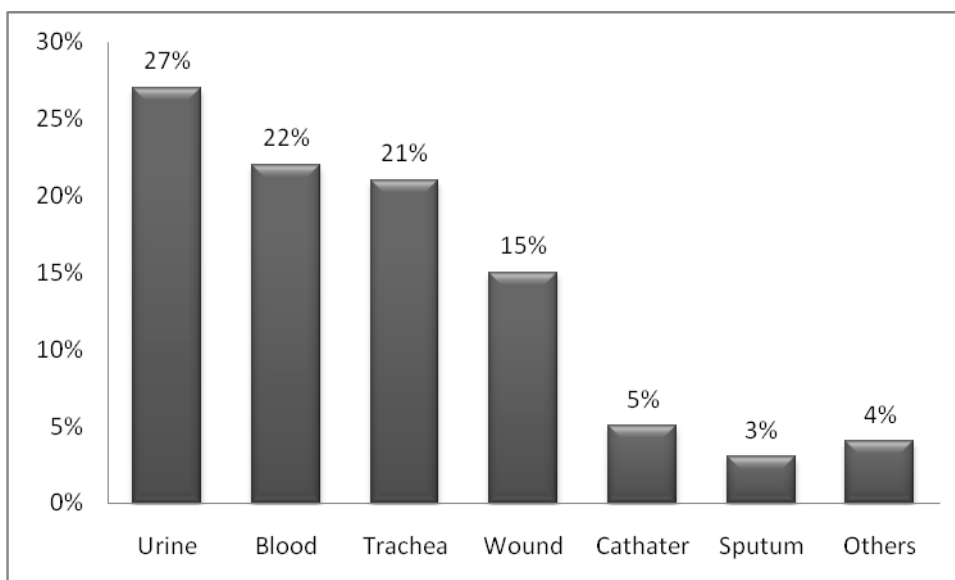
تصویر ۴-۱: سمت راست: نتیجه آزمون اکسیداز، سمت چپ: نتیجه تست های فنوتیپی تعیین هویت (از چپ به راست: قلیا/قلیا در محیط TSI، تحرک مثبت و اندول منفی در محیط SIM، متیل رد منفی، VP مثبت و سیترات مثبت).

همانطور که در نمودار ۴-۱ نشان داده شده است نمونه های بالینی از بیماران بستری در بخش های ICU (۴۷-۶۵٪)، داخلی (۲۷-۳۷٪)، اعصاب (۹-۱۲٪)، جراحی (۷-۹٪)، عفونی (۶-۸٪) و ارتوپدی (۴-۶٪) به ترتیب جمع آوری شدند.



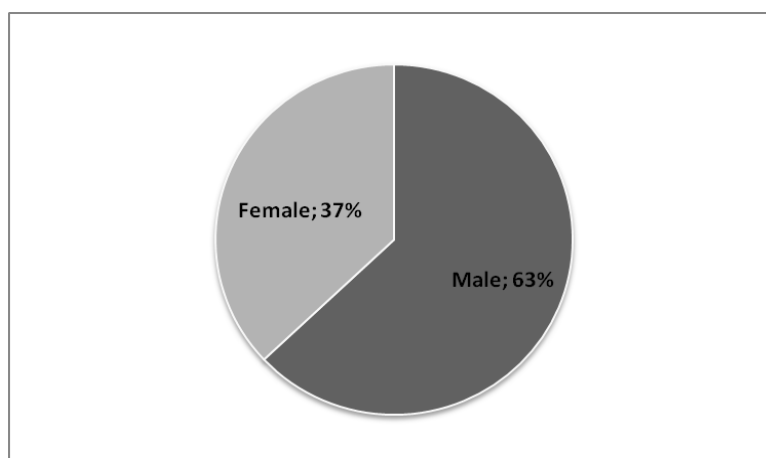
نمودار ۴-۱: فراوانی ایزوله های کلبسیلا بر حسب بخش های بیمارستانی

از این بیماران در مجموع ۳۷ نمونه (۲۷٪) از ادرار، ۳۰ ایزوله (۲۲٪) از نمونه خون، ۲۹ ایزوله (۲۱٪) از نمونه تراشه، ۲۰ ایزوله (۱۵٪) از نمونه زخم، ۷ ایزوله (۵٪) از کاتتر، ۴۳ ایزوله (۳٪) از نمونه خلط و ۶ ایزوله (۴٪) از سایر نمونه های بالینی جمع آوری شدند. نمودار ۴-۲ فراوانی گونه های کلبسیلا را در بر حسب منبع و نوع نمونه های بالینی ارسالی مراکز مورد مطالعه را نشان می دهد.



نمودار ۲-۴: فراوانی ایزوله های کلبسیلا بر حسب نمونه های بالینی

در ادامه با بررسی اطلاعات بیماران مشخص شد که ۸۶ (۶۳٪) از بیماران از جنس مرد و ۵۱ (۳۷٪) بیماران از جنس زن بودند (نمودار ۳-۴).



نمودار ۳-۴: فراوانی ایزوله های کلبسیلا بر حسب جنس

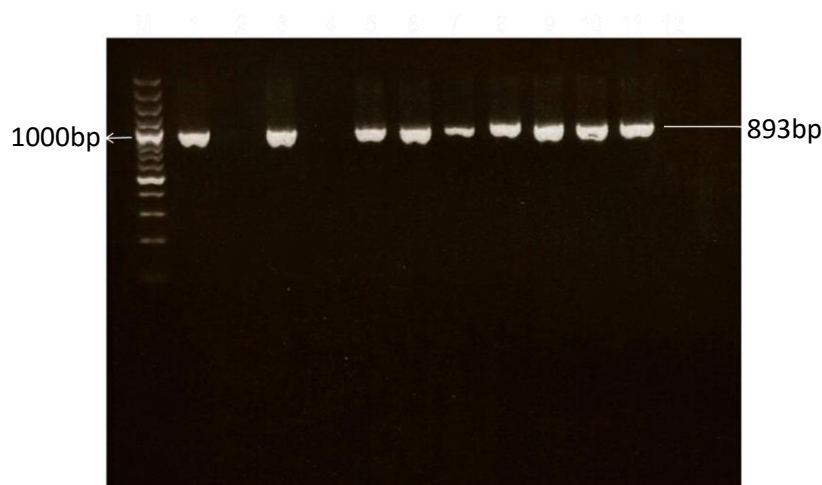
با بررسی میانگین سنی بیماران مشخص شد که بیماران هدف در این مطالعه در محدوده سنی ۱۷ تا ۸۳ سال قرار داشتند که میانگین سنی آنها 50 ± 20 تعیین شد.

الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی

با انجام تست حساسیت آنتی بیوتیکی به روش DAD مشخص گردید که ۸۳ ایزوله (۸۳٪) الگوی مقاومت دارویی چندگانه را نشان دادند و به کلاسهای آنتی بیوتیکی بتالاکتام ، آمینوگلیکوزید و کینولون مقاومت دارویی کامل یا حد واسط نشان دادند. از این تعداد ۲ ایزوله (۲.۴٪) به ایمی پنم مقاومت کامل، ۱۲ ایزوله (۱۴٪/۵) مقاومت متوسط و ۶۹ ایزوله (۸۳٪/۱) حساسیت نشان دادند. همچنین مشخص شد که از بین ارگانسیم های با مقاومت دارویی چندگانه، ۸۰ ایزوله (۹۶٪/۴) به مروپنم حساسیت و ۳ ایزوله (۳٪/۶) مقاومت حدواسط نشان دادند.

شناسایی ملکولی اینتگرون کلاس یک

با انجام آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی اینتگرون کلاس یک بر روی ۱۰۰ ایزوله کلبسیلا مشخص شد که در مجموع ۷۳ ایزوله (۷۳٪) دارای اینتگرون کلاس یک بودند. در ادامه همچنین مشخص شد که از مجموع ۸۳ ایزوله دارای الگوی مقاومت دارویی چندگانه، ۵۲ ایزوله (۶۳٪) از نظر حضور اینتگرون کلاس یک مثبت بودند (جدول ۴-۱). در ادامه بر اساس نتایج انجام آزمون آماری مجذور کای دو ارتباط معنی داری ($p < 0.001$) مابین حضور اینتگرون کلاس یک و الگوی مقاومت دارویی چندگانه گزارش شد.



تصویر ۴-۲: حضور اینتگرون کلاس یک در آزمون PCR

جدول ۴-۱: حضور اینتگرون کلاس یک در ایزوله های کلبسیلا با مقاومت دارویی چندگانه

MDR * INT Crosstabulation					
			INT		Total
			Pos	Neg	
MDR	P	Count	52	31	83
		% within MDR	62.7%	37.3%	100.0%
		% within INT	71.2%	48.4%	60.6%
		% of Total	38.0%	22.6%	60.6%
	N	Count	21	33	54
		% within MDR	38.9%	61.1%	100.0%
		% within INT	28.8%	51.6%	39.4%
		% of Total	15.3%	24.1%	39.4%
Total		Count	73	64	137
		% within MDR	53.3%	46.7%	100.0%
		% within INT	100.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	53.3%	46.7%	100.0%

ارتباط مابین حضور اینتگرون کلاس یک و الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی

جدول ۴-۲ ارتباط مابین حضور اینتگرون کلاس یک و الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی نسبت به آنتی بیوتیک های به کار رفته در مطالعه را نشان می دهد. در این مطالعه ارتباط معنی داری مابین حضور اینتگرون کلاس یک و مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های جنتامایسین، آموکسی سیلین/ کلارولانیک اسید، سفوتاکسیم، سفتریاکسون، سفتازیدیم، سفپودوکسیم، آزترونام، پپراسیلین، تری متوپریم-سولفومتوکسازول گزارش شد.

جدول ۴-۲: بررسی مقایسه ای الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله های کلبسیلا اینتگرون مثبت و منفی

AB	Integron Pos. Isolates			Integron Neg. Isolates			P value
CTX	44(32%)	19(14%)	7(5%)	30(22%)	36(26/5%)	-	<0.001
CAZ	41(30%)	24(17/5%)	6(4%)	27(20%)	36(26%)	3(2%)	0.005
CPD	41(30%)	20(15%)	10(7%)	28(20%)	38(28%)	-	<0.001
ATM	38(28%)	24(17/5%)	9(7%)	27(20%)	36(26%)	3(2%)	0.005
CRO	45(33%)	24(17/5%)	2(1/5%)	27(20%)	37(27%)	2(1/5%)	0.003
AGU	66(49%)	-	5(4%)	54(40%)	6(4%)	6(4%)	0.009
CIP	11(8%)	44(32%)	16(12%)	14(10%)	49(36%)	3(2%)	0.13
GEN	39(28/5%)	21(29%)	3(2%)	2(1/5%)	64(47%)	-	<0.001
PTZ	6(4%)	56(41%)	9(7%)	14(10%)	44(32%)	8(6%)	0.196
CPM	11(8%)	60(44%)	-	8(6%)	58(42%)	-	0.42
IMI	2(1/5%)	60(44%)	9(7%)	-	58(42%)	8(6%)	0.119
MRM	-	71(52%)	-	-	63(46%)	3(2%)	0.55
TGC	42(30%)	7(5%)	22(16%)	37(27%)	5(4%)	24(17/5%)	0.47
TS	57(42%)	14(10%)	-	15(11%)	51(37%)	-	<0.001
NIT	53(39%)	16(12%)	2(1/5%)	52(38%)	11(8%)	3(2%)	0.324
GAT	2(1/5%)	60(44%)	9(7%)	3(2%)	59(43%)	4(3%)	0.324
NOR	9(7%)	54(40%)	8(6%)	11(8%)	52(38%)	3(2%)	0.50
PRL	47(34%)	21(15%)	3(2%)	30(22%)	36(26%)	-	<0.001

بحث: ارگاناسم های با مقاومت دارویی چندگانه در دو دهه اخیر افزایش قابل ملاحظه ای داشته اند که مشکلات فراوانی را برای پزشکان بالینی، میکروب شناسان و متخصصین کنترل عفونت ایجاد کرده اند. اعضاء خانواده انتروباکتریاسه از جمله *E. coli*، کلبسیلا پنومونیه، گونه های پروتئوس، گونه های سراشیا، گونه های کلبسیلا، سالمونلا و شیگلا از جمله باکتریهای مهم دخیل در عفونت های بیمارستانی محسوب می شوند. نقش این ارگاناسم های در بخش های بحرانی بیمارستانی به ویژه بخش های مراقبت ویژه (ICU) از اهمیت بالاتری برخوردار است. در سالهای اخیر این ارگاناسم ها غالباً به سبب پتانسیل و کسب فاکتورهای مختلف مقاومت دارویی غالباً ماهیت و الگوی مقاومت دارویی چندگانه کسب کرده اند که این امر مشکلات فراوانی را برای پزشکان، متخصصان عفونی و کنترل عفونت در کلینیک و بیمارستان ها ایجاد کرده است. فاکتورهای ایجاد کننده مقاومت دارویی غالباً یا ماهیت کروموزومی دارند یا به واسطه عناصر سیار ژنتیکی (The mobile genetic elements) از جمله پلاسمیدها، اینتگرون ها و ترانسپوزون ها از سایر نمونه های باکتریایی کسب می شوند. نقش این عناصر سیار ژنتیکی به ویژه در عفونت های بیمارستانی بسیار حائز اهمیت است زیرا مقدمات سریع انتشار فاکتورهای مقاومت به واسطه این عناصر فراهم می شود. اینتگرون ها به عنوان یکی از عناصر سیار ژنتیکی به سمت قابلیت کسب انواع کاست های ژنی حامل ژن مقاومت در سالهای اخیر بسیار مورد توجه هستند. تا به حال کلاس های مختلفی از این عناصر سیار شناسایی شده است که براساس مطالعات انجام شده، اینتگرون کلاس یک در باکتریهای گرم منفی به ویژه خانواده انتروباکتریاسه از شیوع بالایی برخوردار بوده و به سبب قابلیت پذیرش کاست های مختلف مقاومت دارویی مقدمات مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های عمده مصرفی در بیمارستان ها از جمله داروهای بتالاکتام، آمینوگلیکوزیدها و کلرامفنیکل را فراهم می سازند (۲۷، ۲۸).

هرچند اطلاعات فراوانی در خصوص شیوع کلاس‌های مختلف اینتگرونی در گونه‌های کلبسیلا و اشرشیاکلی وجود دارد ولی در گونه‌های کلبسیلا اطلاعات بسیار کمی در سراسر جهان وجود دارد. در مجموع مطالعات مختلفی که در سراسر جهان شیوع کلاس‌های مختلف اینتگرونی و محتوی آنها از نظر وجود فاکتورهای مختلف مقاومت دارویی بررسی کرده‌اند نتایج متفاوتی حاصل شده است. به طوری که شیوع اینتگرون کلاس یک در باکتری‌های بیماریزای گرم منفی از ۲۸/۵ درصد تا ۸۹/۲ درصد گزارش شده است. (۷۱، ۷۴-۷۸) در مجموع نتایج حاکی از آن است که شیوع اینتگرون‌ها در ایزوله‌های بیمارستانی و حتی اکتسابی از جامعه در نواحی جغرافیایی مختلف، جمعیت‌های مختلف و حتی در بخش‌های مختلف بیمارستانی به میزان معنی‌داری متفاوت است.

براساس نتایج حاصل از این مطالعه در مجموع ۷۳ ایزوله (۷۳ درصد) از نظر حضور اینتگرون کلاس یک مثبت بودند. در ادامه با بررسی بیشتر مشخص شد که در این مطالعه ۸۳ ایزوله الگوی مقاومت دارویی چندگانه را نشان دادند که در میان این ایزوله‌ها ۶۳٪ از نظر حضور اینتگرون کلاس یک مثبت بودند.

نتایج این مطالعه در مقایسه با سایر مطالعات از نظر شیوع اینتگرون کلاس یک، آمار متفاوتی را نشان داد به طوری که در مقایسه با برخی از مطالعات از آماری بالاتری برخوردار بود از جمله مطالعه Huan و همکارانش در سال ۲۰۰۷ در چین مشخص شد که ۳۴٪ از ایزوله‌های خانواده انتروباکتریاسه از نظر حضور اینتگرون کلاس یک مثبت بودند (۶۱). همچنین در مقایسه با مطالعه Bado و همکارانش که در سال ۲۰۱۰ در اروگوئه انجام شد، مشخص شد که ۳۸٪ از ایزوله‌ها از نظر حضور اینتگرون کلاس یک مثبت بودند (۶۲). همچنین Machado و همکارانش در سال ۲۰۰۷ با بررسی حضور اینتگرون کلاس یک در ایزوله‌های کلبسیلاسیه گزارش کردند که در مجموع ۲۳ درصد از ایزوله‌ها حاوی اینتگرون کلاس یک بودند (۷۰) و در مطالعه Dakic و

همکارانش در سال ۲۰۰۷ بر روی ۷۳ ایزوله انتروباکتریاسه جدا شده از بیماران سرپائی مبتلا به عفونت ادراری، شیوع اینتگرون کلاس یک ۱۷/۸ درصد گزارش شد (۷۲).

در ادامه مشخص گردید که نتایج این مطالعه در مقایسه با برخی مطالعات در سایر نواحی جغرافیایی جهان از آماری شیوع بالاتری کمتری بود به طوری که در مطالعه Ibrahim و همکارانش در سال ۲۰۱۱ بر روی ۱۶۰ ایزوله انتروباکتریاسه تولید کننده ESBL مشخص شد که ۶۱/۴ درصد از ایزوله ها دارای اینتگرون کلاس یک بودند (۶۳). در مطالعه Yan و همکارانش در سال ۲۰۱۰ بر روی ۱۱۸ ایزوله بالینی گرم منفی در چین ۷۶/۳٪ از ایزوله ها از نظر حضور اینتگرون کلاس یک مثبت بودند (۶۴).

در مجموع با بررسی الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله های کلبسیلا مشخص شد که ۶۳ درصد از ایزوله ها الگوی مقاومت داروئی چندگانه را نشان دادند که در مقایسه با مطالعه Dakic و همکارانش در سال ۲۰۰۷ بر روی ۷۳ ایزوله انتروباکتریاسه انجام شد (۷۲٪). در مجموع ۵۰/۷٪ درصد گزارش شد، از آمار بالاتری برخوردار بود که البته ماهیت بیمارستانی و بالینی نتایج مطالعه حاضر با مطالعه مورد نظر که از بیماران سرپائی بود چندان دور از انتظار نبود.

در این مطالعه اکثر ایزوله ها حاوی اینتگرون از بخش ICU جداسازی شدند که در مقایسه با نتایج اکثر مطالعاتی که در این زمینه انجام شد، همخوانی دارد. به نظر می رسد بستری طولانی مدت بیماران در این بخش، وخیم بودن حال بیماران، به کار بردن ابزارهای تهاجمی درمانی از قبیل تراشه و کاتتر، مواجه بودن بیماران با آنتی بیوتیک های وسیع الطیف و نهایتاً نبود ابزارها و راهکارهای مناسب کنترل عفونت از دلایل عمده شیوع ارگانیزم های مقاوم در این بخش می باشد.

در این مطالعه با بررسی ارتباط مابین حضور اینتگرون کلاس یک و مقاومت به آنتی بیوتیک های به کار رفته در مطالعه مشخص شد که ارتباط معنی داری مابین مقاومت به داروهای

بتالاکتام مصرفی و حضور اینتگرون کلاس یک وجود داشت که در مقایسه با سایر مطالعاتی که در این زمینه انجام شد ارتباط معنی داری ما بین حضور اینتگرون کلاس یک و مقاومت به سفالوسپورین ها گزارش شد. به همین منظور، Yan و همکارانش در سال ۲۰۱۰ با بررسی بر روی ایزوله‌های بالینی گرم منفی در چین گزارش کردند که ارتباط معنی داری ما بین حضور اینتگرون کلاس یک و مقاومت به داروهای بتالاکتام وجود داشت (۶۴).

Peyse و همکارانش در سال ۲۰۰۳ نیز گزارش کردند که ایزوله‌های حاوی اینتگرون در مقایسه با ایزوله‌های فاقد آن به طور معنی داری نسبت به داروهای آمپی سیلین و سفوتاکسیم مقاومت نشان دادند (۶۷). در مجموع این موضوع خیلی دور از انتظار نیست زیرا براساس مطالعات انجام شده بخش عمده ای از ژن‌های بتالاکتاماز توسط اینتگرون کلاس یک انتقال می‌یابند. ژن‌های بتالاکتامازهای تیپ OXA و متالوبتالاکتامازها و برخی از بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) با قرارگیری بر روی کاست های ژنی توسط اینتگرون کلاس یک انتقال می یابند که نهایتاً مقدمات مقاومت دارویی نسبت به طیف وسیعی از داروهای بتالاکتام از جمله سفالوسپورین های وسیع الطیف، پنی سیلین ها، ترکیبات مهارکننده بتالاکتامازها و حتی کرباپنم ها را فراهم می سازند (۵۰).

در ادامه مطالعه همچنین مشخص شد که ارتباط معنی داری ما بین حضور اینتگرون کلاس یک و مقاومت به آنتی بیوتیک‌های خانواده آمینوگلیکوزیدها وجود داشت که نتایج حاصل از آن با نتایج سایر مطالعات مشابه که در این زمینه انجام شد همخوانی داشت.

به طوری که در مطالعه Mokracka و همکارانش در سال ۲۰۰۳ مشخص شد که ارتباط معنی داری بالینی حضور اینتگرون کلاس یک و مقاومت ایزوله های اینتروباکتر به داروهای خانواده آمینوگلیکوزید وجود داشت (۶۵). و در مطالعه Yan و همکارانش در سال ۲۰۱۰ نیز نتایج مشابهی بدست آمد بدین ترتیب که ایزوله های گرم منفی حاوی اینتگرون در این مطالعه در

مقایسه با ایزوله‌های بدون اینتگرون به میزان معنی‌داری در برابر آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزید مقاومت نشان دادند (۶۴). همچنین Huan و همکارانش نیز گزارش کردند که در مجموع ارتباط معنی‌داری ما بین حضور اینتگرون کلاس یک و مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در ایزوله‌های اینتروباکتریاسه وجود داشت (۶۱).

این ارتباط نیز خیلی بعد از انتظار نیست چرا که براساس مطالعات که در این زمینه انجام شده است مشخص شد که بخش عمده‌ای از ژن‌های ژنی مقاومت آمینوگلیکوزیدها از جمله (ژن‌های acc و aad) بر روی اینتگرون کلاس یک انتقال می‌یابند (۷۹).

در این مطالعه ارتباط معنی‌داری ما بین حضور اینتگرون کلاس یک و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های خانواده کینولون مشاهده نشد. در حالی که در مطالعه Haun و همکارانش در سال ۲۰۰۷ و Peyse و همکارانش در سال ۲۰۰۳ ارتباط معنی‌داری بدین منظور گزارش شد (۶۱، ۶۷). به نظر می‌رسد نتایج حاصل از این مطالعه خیلی دور از انتظار نیست زیرا براساس مطالعات انجام شده در خصوص مکانیسم مقاومت به کینولون‌ها مشخص شده است که مقاومت به کینولون‌ها غالباً به واسطه جهش‌های نقطه‌ای در ژن‌های کروموزومی اتفاق می‌افتد و در سال‌های اخیر نیز مقاومت نسبت به این داروها نیز به واسطه ژنهای پلاسمیدی qnr نیز از سراسر جهان شناسایی شده و گزارش می‌شوند.

در مجموع نتایج حاصل از مطالعه حاکی از آمار قابل توجه حضور اینتگرون کلاس در ایزوله‌های کلبسیلا جمع‌آوری شده از بیمارستان‌های مورد مطالعه است. با توجه به نقش حضور اینتگرون کلاس یک، در انتشار فاکتورهای مختلف مقاومت دارویی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مهمی از جمله داروهای بتالاکتام، آمینوگلیکوزیدها و تتراسایکلین لذا لزوم توجه بیشتر به آنها ضروری است. در عین حال، به سبب ماهیت سیار اینتگرون‌ها و چرخش آن ما بین گونه‌های

مختلف باکتری‌های دخیل در عفونت‌های بیمارستانی، به کارگیری از ابزارهای مناسب کنترل عفونت و راهکارهای مناسب درمانی برای جلوگیری از انتشار بیشتر آنها ضروری است.

نتایج نهایی حاصل از این مطالعه حاکی از آن است که باکتری‌های جنس کلبسیلا حاوی اینتگرون کلاس یک در مراکز بیمارستانی مورد مطالعه شیوع فراوانی یافته‌اند. براساس نتایج بدست آمده از این مطالعه، 63 درصد از ایزوله‌های انتروباکتر با الگوی مقاومت دارویی چندگانه جدا شده از بخش‌های مختلف بیمارستانی از نظر حضور اینتگرون کلاس یک مثبت بودند. با توجه به اینکه ایزوله‌های حاوی اینتگرون غالباً "از بخش ICU بیمارستان‌های مورد مطالعه جمع‌آوری شدند امید آن است که با بهره‌گیری از الگوی صحیح مصرف آنتی‌بیوتیک، و محدود سازی استفاده از داروهای بتالاکتام به ویژه سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف، و به کارگیری ابزارهای مناسب کنترل عفونت شاهد کاهش حضور این ارگانیسم‌های مقاوم در بخش‌های مختلف بیمارستانی باشیم.

پیشنهادات:

۱. از آنجائیکه در این مطالعه فراوانی اینتگرون کلاس یک در ایزوله های کلبسیلا

بررسی شد پیشنهاد می شود جهت تکمیل مطالعه و شناسایی قطعی مکانیسم های

های مقاومت، کاست های ژنی موجود در اینتگرون ها با استفاده از روش های ملکولی

بررسی شوند.

۲. پیشنهاد می شود که فراوانی دیگر کلاس های اینتگرون نیز در این ایزوله ها بررسی

شوند و نقش احتمالی آنها در بروز فاکتورهای مختلف مقاومت دارویی نیز بررسی

شود.

منابع:

1. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Mprse SA, Mietzner TA. Medical Microbiology. United States.25th ed, The McGraw-Hill Companies, 2010; Chapter15, Page 219.
2. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 11th edition, Saint Louis, USA, Elsevier (Mosby). 2002:936-7.
3. Chow, J. W., V. L. Yu, and D. M. Shlaes. 1994. Epidemiologic perspectives on *Enterobacter* for the infection control professional. Am. J. Infect. Control 22:195–201.
4. Chow, J. W., M. J. Fine, D. M. Shlaes, J. P. Quinn, D. C. Hooper, M. PJohnson, R. Ramphal, M. M. Wagener, D. K. Miyashiro, and V. L. Yu. 1991. *Enterobacter* bacteremia: clinical features and emergence of antibiotic resistance during therapy. Ann. Intern. Med. 115:585–590.
5. Kaye, K. S., S. Cosgrove, A. Harris, G. M. Eliopoulos, and Y. Carmeli. 2001. Risk factors for emergence of resistance to broad-spectrum cephalosporins among *Enterobacter* spp. Antimicrob. Agents Chemother. 45:2628–2630.
6. Irene Galani, Maria Souli, Zoi Chryssouli, Konstantina Orlandou and Helen Giamarellou*Characterization of a new integron containing blaVIM-1 and aac(60)-IIc in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate from Greece. Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2005) 55, 634–638
7. Sanders, W. E., Jr., and C. C. Sanders. 1997. *Enterobacter* spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. Clin. Microbiol. Rev. 10:220-241.
8. Schwaber, M. J., C. S. Graham, B. E. Sands, H. S. Gold, and Y. Carmeli. 2003. Treatment with a broad-spectrum cephalosporin versus piperacillintazobactam and the risk for isolation of broad-spectrum cephalosporinresistant *Enterobacter* species. Antimicrob Agents Chemother. 47:1882–1886
9. Fridkin, S. K., and R. P. Gaynes. 1999. Antimicrobial resistance in intensive care units. Clin. Chest Med. 20:303–316, viii.

10. Dalben, M., Varkulja, G., Basso, M., Krebs, V.L., Gibelli, M.A., van der Heijden, I., Rossi, F., Duboc, G., Levin, A.S., Costa, S.F., 2008. Investigation of an outbreak of *Enterobacter cloacae* in a neonatal unit and review of the literature. J. Hosp. Infect. 70, 7–14.
11. M. Biendo, B. Canarelli, D. Thomas, F. Rousseau, F. Hamdad, C. Adjide, G. Laurans, and F. Eb. Successive Emergence of Extended Spectrum beta-Lactamase-Producing and Carbapenemase-Producing *Enterobacter aerogenes* Isolates in a University Hospital. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Mar. 2008, p. 1037–1044
12. Fred C. Tenover, PhD .Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria . The American Journal of Medicine (2006) Vol 119 (6A), S3–S10
13. Bush K. Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. Curr Opin Microbiol. 2010 Oct; 13(5):558-64.
14. Maragakis LL. Recognition and prevention of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in the intensive care unit. Crit Care Med. 2010 Aug;38(8 Suppl):S345-51.
15. Giamarellou H, Poulakou G. Multidrug-resistant Gram-negative infections: what are the treatment options? Drugs. 2009 Oct 1; 69(14):1879-901.
16. Dé E, Baslé A, Jaquinod M, Saint N, Malléa M, Molle G, Pagès JM. A new mechanism of antibiotic resistance in Enterobacteriaceae induced by a structural modification of the major porin. Mol Microbiol. 2001 Jul; 41(1):189-98.
17. Bornet C, Davin-Regli A, Bosi C, Pages JM, Bollet C. Imipenem resistance of *enterobacter aerogenes* mediated by outer membrane permeability. J Clin Microbiol. 2000 Mar; 38(3):1048-52.
18. Masi M, Pagès JM, Pradel E. Production of the cryptic EefABC efflux pump in *Enterobacter aerogenes* chloramphenicol-resistant mutants. J Antimicrob Chemother. 2006 Jun; 57(6):1223-6.
19. Chevalier J, Mulfinger C, Garnotel E, Nicolas P, Davin-Régli A, Pagès JM. Identification and evolution of drug efflux pump in clinical *Enterobacter*

- aerogenes* strains isolated in 1995 and 2003. PLoS One. 2008 Sep 12; 3(9):e3203.
20. Bornet C, Chollet R, Malléa M, Chevalier J, Davin-Regli A, Pagès JM, Bollet C. Imipenem and expression of multidrug efflux pump in *Enterobacter aerogenes*. Biochem Biophys Res Commun. 2003 Feb 21; 301(4):985-90.
 21. McGowan, J. E., Jr. Resistance in nonfermenting gram negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. Am J Infect Control; 2006; 34, S29-S37.
 22. Pentti Huovinen .Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole .Clinical Infectious Diseases 2001; 32:1608–14
 23. D M Livermore .Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin. Microbiol. Rev. 1995, 8(4):557.
 24. Ambler, R. P. (1980). The structure of b-lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 289, 321–331.
 25. Barbosa TM, Levy SB.The impact of antibiotic use on resistance development and persistence .Drug Resist Updat. 2000 Oct; 3(5):303-311.
 26. Svara F, Rankin DJ.The evolution of plasmid-carried antibiotic Resistance . BMC Evol Biol. 2011 May 19; 11(1):130.
 27. Hall RM, Collis CM. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. Mol Microbiol. 1995 Feb; 15(4):593-600. Review.
 28. Rowe-Magnus DA, Mazel D. Role of integrons in antibiotic resistance gene capture. Int J Med Microbiol. 2002 Jul; 292(2):115-25.
 29. Kong KF, Schneper L, Mathee K. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. APMIS. 2010 Jan; 118(1):1-36.
 30. Giamarellou H. Fourth generation cephalosporins in the antimicrobial chemotherapy of surgical infections. J Chemother. 1999 Dec; 11(6):486-93. Review

31. Moellering RC Jr, Eliopoulos GM, Sentochnik DE. The carbapenems: new broad spectrum β -lactam antibiotics. J Antimicrob Chemother. 1989 Sep; 24 Suppl A: 1-7.
32. Jacoby GA, Munoz-Price LS. The New β -Lactamases .N Engl J Med. 2005 Jan 27; 352(4):380-91.
33. Nordmann, P. & Guibert, M. (1998). Extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother 42, 128–131.
34. Bradford, P. A. (2001). Extended-spectrum β -lactamases in the 21st Century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 14, 933–951.
35. Biendo M, Manoliu C, Laurans G, Castelain S, Canarelli B, Thomas D, Hamdad F, Rousseau F, Eb F. Molecular typing and characterization of extended-spectrum TEM, SHV and CTX-M β -lactamases in clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. Res Microbiol. 2008 Nov-Dec; 159(9-10):590-4.
36. Knox JR. Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type β -lactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39:2593-601.
37. Sirot D, Recule C, Chaibi EB, et al. A complex mutant of TEM-1 β -lactamase with mutations encountered in both IRT-4 and extended-spectrum TEM-15, produced by an *Escherichia coli* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41:1322-5.
38. Jacoby G, Bush K. Amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant β -lactamases. (Accessed January 3, 2005, at <http://www.lahey.org/studies/webt.htm>.)
39. Kasap M, Fashae K, Torol S, Kolayli F, Budak F, Vahaboglu H. Characterization of ESBL (SHV-12) producing clinical isolate of *Enterobacter aerogenes* from a tertiary care hospital in Nigeria. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2010 Jan 12; 9:1.

40. Kuzin AP, Nukaga M, Nukaga Y, Hujer AM, Bonomo RA, Knox JR. Structure of the SHV-1 b-lactamase. *Biochemistry* 1999; 38: 5720-7.
41. Chanawong, A., M'Zali, F. H., Heritage, J., Lulitanond, A. & Hawkey, P. M. SHV-12, SHV-5, SHV-2a and VEB-1 extended-spectrum b-lactamases in gram-negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand. *J Antimicrob Chemother.* 2001; 48, 839–852.
42. Bonnet R. Growing group of extended spectrum b-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Jan; 48(1):1-14.
43. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005; 18(2):306-25.
44. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type b-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:1-11.
45. Mugnier, P., Casin, I., Bouthors, A.-T. & Collatz, E. Novel OXA-10-derived extended-spectrum b-lactamases selected in vivo or in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42, 3113–3116.
46. Hoffmann H, Stürenburg E, Heesemann J, Roggenkamp A. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases in isolates of the *Enterobacter cloacae* complex from German hospitals. *Clin Microbiol Infect.* 2006 Apr; 12(4):322-30.
47. Naas, T. & Nordmann, P. OXA-type b-lactamases. *Curr Pharm Des.* 1999; 5, 865-879.
48. Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:15-22.
49. Rasmussen BA, Bush K. Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(2):223-32.
50. Gerhard F. Weldhagen. Integrins and beta-lactamases-a novel perspective on resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents* 23 (2004) 556–562

51. Vakulenko, S. B. & Mobashery, S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev.* 2003; 16, 430–450.
52. Oliphant CM, Green GM. Quinolones: A Comprehensive Review .*Am FAM Physician.* 2002 Feb 1; 65(3):455-64.
53. Hooper DC . Emerging Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance .*Emerg Infect Dis.* 2001 Mar-Apr; 7(2):337-41. Review.
54. Robillard NJ, Scarpa AL. Genetic and physiological characterization of ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32(4):535-9.
55. Jacob Strahilevitz, George A. Jacoby, David C. Hooper and Ari Robicsek Plasmid-Mediated Quinolone Resistance: a Multifaceted Threat . *Clin. Microbiol. Rev.* 2009, 22(4):664.
56. Nijssen S, Florijn A, Top J, Willems R, Fluit A, Bonten M. Unnoticed spread of integron-carrying Enterobacteriaceae in intensive care units. *Clin Infect Dis.* 2005 Jul 1;41(1):1-9.
57. Patzer, J. A., Toleman, M. A., Grzesik, A., Dzierzanowska, D. & Walsh, T. R. (2005). The diverse integron structures disseminating VIM genes in Poland. *Clin Microbiol Infect* 11 (Suppl. 2), 100.
58. Akram M, Shakil S, Khan AU. Prevalence of integrons, blaCTX-M and blaTEM resistance markers among ESBL-producing uropathogenic *Escherichia coli* isolates: first report of genomic blaCTX-M from India. *J Chemother.* 2011 Jun; 23(3):131-4.
59. Yatsuyanagi, J., Saito, S., Harata, S., Suzuki, N., Ito, Y., Amano, K. & Enomoto, K. Class 1 integron containing metallo- β -lactamase gene blaVIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48, 626–628.
60. Severino P, Magalhães V.D. Integrons as tools for epidemiological studies. *Clin Microbiol Infect,* 2004; 10, 156-62.

61. WANG Huan¹, FAN Xiao-lei. Relationship between class 1 integron and resistance in gram negative bacteria
62. Bado I, Cordeiro NF, Robino L, García-Fulgueiras V, Seija V, Bazet C, Gutkind G, Ayala JA, Vignoli R.. Detection of class 1 and 2 integrons, extended-spectrum beta-lactamases and qnr alleles in enterobacterial isolates from the digestive tract of Intensive Care Unit inpatients. *Int J Antimicrob Agents*. 2010 Nov; 36(5):453-8.
63. Ibrahim N, Wajidi MF, and Yusof MY, Tay ST. The integron prevalence of extended-spectrum beta-lactamase producing enterobacterial isolates in a Malaysian teaching hospital. *Trop Biomed*. 2011 Dec; 28(3):668-71.
64. He Yan, Lin Li, Minhua Zong, Muhammad Jahangir Alam, Sumio Shinoda, and Lei Shi. Occurrence and Characteristics of Class 1 and 2 Integrons in Clinical Bacterial Isolates from Patients in South China. Volume 56, Number 4, August 2010
65. Mokracka J, Koczura R, Pawlowski K, Kaznowski A Resistance patterns and integron cassette arrays of *Enterobacter cloacae* complex strains of human origin. *J Med Microbiol*. 2011 Jun;60(Pt 6):737-43.
66. Reyes A, Bello H, Domínguez M, Mella S, Zemelman R, González G. Prevalence and types of class 1 integrons in aminoglycoside-resistant Enterobacteriaceae from several Chilean hospitals. *J Antimicrob Chemother*. 2003 Feb; 51(2):317-21.
67. Bhattacharjee A, Sen MR, Prakash P, Gaur A, Anupurba S, Nath G. Observation on integron carriage among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases. *Indian J Med Microbiol*. 2010 Jul-Sep;28(3):207-10.
68. Peymani A, Farajnia S, Nahaei MR, Sohrabi N, Abbasi L, Ansarin K, Azhari F.. Prevalence of Class 1 Integron among Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in Tabriz, Northwest of Iran. *Pol J Microbiol*. 2012; 61(1):57-60.
69. Machado E, Ferreira J, Novais A, Peixe L, Cantón R, Baquero F, Coque TM. Preservation of integron types among Enterobacteriaceae producing

- extended-spectrum beta-lactamases in a Spanish hospital over a 15-year period (1988 to 2003). *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Jun; 51(6):2201-4.
70. White PA, McIver CJ, Rawlinson WD. Integrons and gene cassettes in the enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Sep; 45(9):2658-61.
 71. Dakić I, Lilakos M, Savić B, -VLAHOVIC, Schwarz S, Poggas N, Charvalos N. Integron-associated antimicrobial resistance in isolates of members of Enterobacteriaceae causing community-acquired urinary infections. *Microbial Ecology in Health and Disease.* 2007; 19: 201_206
 72. Clinical and Laboratory Standard Institute. (2006). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard M2-A9. Wayne, PA.
 73. Kang HY, Jeong YS, Oh JY, Tae SH, Choi CH, Moon DC,et al. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in Escherichia coli isolates from humans and animals in Korea. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 55: 639-44.
 74. Fluit AC, Schmitz FJ. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility and epidemiology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1999; 18: 761-70.
 75. Martinez-Freijo P, Fluit AC, Schmitz FJ, Grek VSC, Verhoef J, Jones ME. Class 1 integrons in gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds. *J Antimicrob Chemother.* 1998; 42: 689-96.
 76. Sallen BA, Rajoharison A, Desvarenne S, Mabilat C. Molecular epidemiology of integron-associated antibiotic resistance genes in clinical isolates of Enterobacteriaceae . *Microb Drug Resist.* 1995; 1: 195-202.
 77. Su J, Shi L, Yang L, Xiao Z, Li X, Yamasaki S. Analysis of integrons in clinical isolates of Escherichia coli in China during the last six years. *FEMS Microbiol Lett.* 2006; 254: 75-80.
 78. Gu B, Tong M, Zhao W, Liu G, Ning M, Pan S, Zhao W. Prevalence and characterization of class I integrons among Pseudomonas aeruginosa and

Acinetobacter baumannii isolates from patients in Nanjing, China. J Clin Microbiol, 2007; 45, 241-3.

Abstract

Prevalence of integron class 1 among multidrug resistant *Enterobacter* spp in Qazvin and Tehran Hospitals

Background: *Enterobacter spp.* are one of the most important nosocomial pathogens that causes a various types of infections. In recent years, there are increasing reports of multidrug resistant *Enterobacter spp.* outbreaks in clinical settings worldwide. Class 1 integrons have been found to be the most prevalent in clinical isolates of *Enterobacter spp.* that confer resistance to known antibiotics. The aim of this study was to determine the frequency of class1 integron among multidrug resistant *Enterobacter spp* isolates.

Methods: One hundred and thirty seven non duplicated clinical isolates were collected from Imam Qazvin hospitals. All isolates were identified using standard laboratory methods. Antimicrobial susceptibility profiles were determined against the selected antimicrobilas using the standard Kirby Bauer disk diffusion method according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline. PCR assay was performed for detection class 1 integron. The chi-square test was used to determine the association between integron carriage and antimicrobial susceptibility patterns.

Results: Among one hundred isolates that studied, 83isolates (61%) exhibited the MDR pattern. Fifty two (63%) of MDR isolates were found to have the class 1 integron. Analysis of data revealed a significant association between MDR pattern and presence of class 1 integron ($p < 0.001$). The results also showed that integron-positive isolates were statistically more resistant to aminoglycoside and the most beta-lactam compounds.

Discussion: This study showed high prevalence of class 1 integron among *Enterobacter spp* isolated from our hospital settings. Considering the significant association between integron carriage and reduced susceptibility to variety of antibiotics, use of appropriate infection control strategy and a regular surveillance system is necessary to prevent further spread of infection by these organisms.

Keywords: *Enterobacter spp*, Multidrug resistant, Integron class 1